

Gestörte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose

Miriam Isabell Koch



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

*Gestörte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine
bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Miriam Isabell Koch
aus Korbach

Gießen 2012

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. med. W. Seeger
Klinikum der Justus-Liebig-Universität in Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Günther

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Tag der Disputation: 24.06.2013

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das pulmonale Surfactant-System	1
1.2	Der morphologische Aufbau des alveolären Kompartments	1
1.3	Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants	2
1.3.1	Lipide	2
1.3.2	Proteine	3
1.3.2.1	Surfactantprotein A	3
1.3.2.2	Surfactantprotein B	4
1.3.2.3	Surfactantprotein C	8
1.3.2.4	Surfactantprotein D	9
1.4	Der Metabolismus des pulmonalen Surfactants	10
1.4.1	Synthese und Speicherung	10
1.4.2	Freisetzung und Wiederaufnahme	10
1.5	Die Funktionen des pulmonalen Surfactants	12
1.5.1	Reduzierung der Oberflächenspannung	12
1.5.2	Bedeutung für den Gasaustausch	14
1.5.3	Immunregulatorische Effekte	14
1.6	Die Idiopathische Pulmonale Fibrose als Form einer ILD	15
1.6.1	Diagnose einer IPF	16
1.6.2	Epidemiologie und Sozioökonomische Bedeutung	19
1.7	Pathomechanistische Konzepte zur Entwicklung einer IPF	19
1.7.1	Die epitheliale Apoptose und der ihr zugrunde liegende ER Stress als möglicher Auslöser einer IPF	20
1.7.2	Die Rolle von oxidativem Stress	21
1.7.3	Die Rolle von Wachstumsfaktoren – Die gemeinsame Endstrecke fibrosierender Lungenerkrankungen	22
1.7.4	Die Rolle des Surfactants bei interstitiellen Lungenerkrankungen	22
1.8	Die Therapie der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose	23
1.9	Fragestellung	26

2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Materialien	27
2.1.1	Labortechnische Geräte	27
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3	Antikörper	30
2.1.4	Oligonukleotide (Primer für RT-PCR)	31
2.1.5	Phospholipide	32
2.1.6	Verwendete Kits	32
2.1.7	Lungengewebe	32
2.1.8	Bronchoalveoläre Lavage	34
2.2	Methoden	36
2.2.1	Genexpressionsanalyse	36
2.2.1.1	Isolierung von RNA	36
2.2.1.2	Bestimmung des RNA-Gehaltes	36
2.2.1.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	37
2.2.1.4	Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion (Semi-quantitative PCR)	38
2.2.1.5	Analyse des PCR-Produktes durch DNA-Agarosegelelektrophorese	39
2.2.2	Analyse von Proteinen	40
2.2.2.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Lungengewebe (Lungenhomogenate)	40
2.2.2.2	Quantitative Proteinbestimmung mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit	41
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	42
2.2.2.4	Proteinanfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Stain)	45
2.2.2.5	Immunologische Verfahren	45
2.2.3	Analyse von Lipiden	47
2.2.3.1	Lipidextraktion nach Bligh und Dyer	47
2.2.3.2	Colorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes	48
2.2.3.3	Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC)	49
2.2.4	Napsin A-Aktivitäts Assay	52
2.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse	53
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Analyse des Prozessierungsstatus und des Gehaltes an hydrophoben Surfactantproteinen in der BAL von IPF-Patienten	54
3.2	Analyse des Prozessierungsstatus und des Gehalts an hydrophoben Surfactantproteinen und der beteiligten Proteasen in Lungenhomogenaten	56

3.3	Untersuchungen auf Genexpressionsebene	58
3.4	Die Aktivität der Protease Napsin A in IPF-, COPD- und Spenderlungen	61
3.5	Analyse der Surfactantveränderungen in Abhängigkeit des Erkrankungsstadiums	61
3.6	Vergleich der Surfactantprotein-Prozessierung von IPF- mit NSIP (fibrosierender Subtyp)- und COPD-Patienten	63
3.7	Untersuchungen zum Surfactantprotein A	64
3.8	Veränderungen der Phospholipide	65
4	DISKUSSION	70
4.1	Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactant-proteine bei sporadischen Idiopathischen interstitiellen Pneumonien	70
4.2	Konsequenzen der gestörten Surfactant-Prozessierung für den Alveolarraum: Die erhöhte Oberflächenspannung	71
4.3	ER Stress und Apoptose im Alveolarepithel als pathophysiologische Konsequenz der gestörten Surfactant-Prozessierung	73
4.4	Die ungezügelte Fibroblastenproliferation in der IPF	75
4.5	Die reduzierte Napsin A- und Kathepsin H-Expression als mögliche Ursache der Surfactantprotein-Prozessierungsstörungen	76
4.6	Die transkriptionale Regulation der Surfactant-Prozessierung	77
4.7	Die hydrophilen Surfactantproteine A und D bei der IPF	79
4.8	Intrazelluläre Reduktion der Surfactantphospholipide bei der IPF	81
4.9	Die Zusammensetzung der Surfactantproteine bei Patienten mit fibrosierender NSIP und COPD	82
4.10	Fazit	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	SUMMARY	85

7	LITERATURVERZEICHNIS	86
8	ANHANG	98
8.1	Quantitative Auswertungen	98
8.2	Abkürzungsverzeichnis	100
8.3	Abbildungsverzeichnis	103
8.4	Tabellenverzeichnis	105
	PUBLIKATION	106
	ERKLÄRUNG	107
	DANKSAGUNG	108

1 Einleitung

1.1 Das pulmonale Surfactant-System

Als Surfactant (*surface-active-agent*)-Film bezeichnet man eine Mixtur aus Phospholipiden und Proteinen, die den Alveolarraum der menschlichen Lunge auskleidet [Hamm et al., 1992]. Er ist unentbehrlich für die alveoläre Ventilation und den Gasaustausch bei physiologischen transthorakalen Druckverhältnissen, denn an einer reinen Luft-Wasser-Grenzfläche in den Alveolen würde aufgrund der hohen Oberflächenspannung von Wasser ($\sim 70 \text{ mN/m}$) die Tendenz zum Alveolarkollaps bestehen. Tatsächlich jedoch ist die Oberflächenspannung in den Alveolen gesunder Menschen mindestens zehnmal niedriger, als es für eine rein wässrige Oberfläche theoretisch zu erwarten wäre. Dies ist auf die Existenz des Surfactantfilms an der Grenzfläche, mit dadurch bedingter Reduktion der Oberflächenspannung, zurückzuführen. Der Surfactantfilm verhindert so den Kollaps der Alveolen in der endexpiratorischen Stellung der Atmung und trägt zu deren Stabilität und einer physiologischen Atmung bei.

1.2 Der morphologische Aufbau des alveolären Kompartments

Die Alveolen sind als Ort des Gasaustausches luftgefüllte Räume, die durch dünne Interalveolarepten voneinander getrennt werden. Man schätzt ihre Gesamtzahl in beiden Lungen auf ca. 300 Millionen. Die Oberflächen werden von Alveolarepithel bedeckt, welches sich aus Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II zusammensetzt [Crapo et al., 1983]. Die Alveolarzellen Typ I bedecken mit ihrem langstreckigen Aufbau den größten Teil der Alveole und bilden die Blut-Luft-Schranke. Die kubischen Alveolarzellen Typ II (AEC II), die den größeren Anteil der Alveolarepithelzellen einnehmen, bilden die verschiedenen Surfactantbestandteile und sind durch Neusynthese und Recycling einzelner Bestandteile am Metabolismus des Surfactant beteiligt. Daher besitzen sie neben dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) viele Mitochondrien, Golgi-Vesikel und Ribosomen als Zeichen eines aktiven Metabolismus. In Lamellarkörperchen (*lamellar bodies*, Lysosomen-ähnliche Strukturen) werden die verschiedenen Bestandteile des Surfactant gespeichert [Crapo et al., 1983; Young et al., 1985].

In den Alveolen finden sich weiterhin aus dem Blut eingewanderte Alveolarmakrophagen, deren Aufgabe die Phagozytose eingeatmeter Staubpartikel, Allergene und Mik-

roorganismen ist. Im subepithelialen Bindegewebe bilden Fibroblasten elastische und Kollagenfasern als Grundsubstanz des Interstitiums.

1.3 Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants

Das pulmonale Surfactant besteht zu etwa 90 % aus Lipiden und zu etwa 10 % aus Proteinen [Cystal et al., 1991; Harwood, 1987a]. Wiederum 90 % der Lipide werden von Phospholipiden (PL) eingenommen, die restlichen 10 % stellen Neutrallipide dar. Der Proteinanteil wird zur Hälfte von den Surfactant-spezifischen Proteinen ausgefüllt, die nach der Nomenklatur von Possmayer als SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet werden [Possmayer, 1988], Plasmaproteine wie Albumin, Lysozym und Immunglobuline bilden die andere Hälfte (s. Abb. 1).

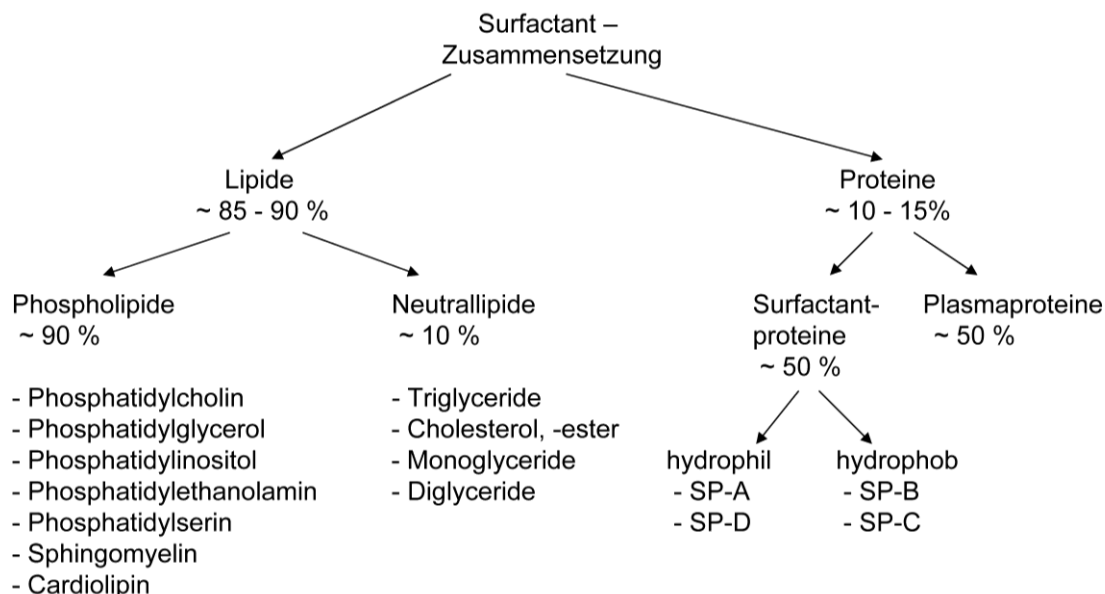


Abbildung 1: Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants

1.3.1 Lipide

Etwa 85 - 90 % des Surfactant besteht aus Lipiden. Die Neutrallipide (hier vor allem Cholesterol) stellen mit 10 % nur einen kleinen Teil dar, der größte Anteil von etwa 90 % wird von Phospholipiden dominiert. Die charakteristische Struktur der amphiphilen PL ist der Glycerol-Grundkörper, mit einer polaren Kopfgruppe und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffschwänzen, den Fettsäuren. Etwa 80 % der Fettsäuren liegen gesättigt vor, den größten Anteil nimmt Palmitinsäure ein.

Den größten Anteil der PL stellt Phosphatidylcholin (PC; etwa 80 %) dar, das etwa zur Hälfte mit zwei gesättigten Fettsäureestern in dipalmitoylierter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt und damit die dominierende Substanz der PL bildet [Crystal et al., 1991; Harwood, 1987b]. Die Gruppe der PL wird komplettiert durch Phosphatidylglycerol (PG), das etwa einen Anteil von 10 % am Gesamt-Phospholipidgehalt einnimmt, sowie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol (PI) mit je etwa 2 - 4 % sowie Phosphatidylserin und Sphingomyelin (jeweils weniger als 2 %) [Harwood, 1987a].

Die Hauptaufgabe der PL ist die Sicherung der biophysikalischen Stabilität. Die während der Atmung notwendige repetitive Dehnung und Stauchung des Phospholipidfilms wird durch die Anwesenheit von verschiedenen Surfactantproteinen stabilisiert. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

1.3.2 Proteine

Etwa 10 - 15 % des Surfactants bilden Proteine. Plasmaproteine wie Albumin und Immunglobuline machen etwa 50 % des Proteinanteils aus, die vier spezifischen Surfactantproteine (SP)-A, -B, -C und -D stellen die andere Hälfte. SP-A und SP-D sind hydrophile Proteine, SP-B und SP-C sind sehr hydrophobe Proteine. SP-A repräsentiert den größten Anteil mit etwa 3 - 4 % der Surfactantmasse, SP-B und SP-C zusammen etwa 2 % [Beers et al., 1992], für SP-D wird eine Konzentration von 0,1 % im gesamten Surfactantpool angegeben [Persson et al., 1989].

1.3.2.1 Surfactantprotein A

Humanes SP-A wird in den alveolären Typ-II-Zellen sowie in den Clara-Zellen synthetisiert [Auten et al., 1990] und liegt in den zwei Isoformen SP-A1 und SP-A2 vor, welche durch die entsprechenden Gene SFTPA1 (MIM 178630) und SFTPA2 (MIM 178642) auf Chromosom 10 kodiert werden [Fisher et al., 1987; Floros et al., 2009]. In den kodierenden Regionen entsprechen sich die Gene zu > 98 %, in den nicht-kodierenden Regionen zu > 90 %. Die beiden maturen Proteine unterscheiden sich nur in vier Aminosäuren [Wang et al., 2009].

Das primäre Translationsprodukt besteht aus 248 Aminosäuren [White et al., 1985] und besitzt eine relative Molmasse von 29 - 31 kDa [Phelps et al., 1986]. Dieses Proprotein durchläuft einige posttranslationale Modifizierungen und weist anschließend eine relative Molmasse von 28 - 36 kDa auf [Phelps et al., 1986; Whitsett et al., 1985]; diese

Streuung ergibt sich durch die variabel ausgeprägte Glykosylierung. Es setzt sich aus 18 Monomeren zusammen, wobei sich sechs Trimere zur charakteristischen Bouquet- oder Blumenstraußform zusammenlagern (s. Abb. 2). Hieraus ergibt sich eine molekulare Masse von 650 kDa [Weis, Drickamer, 1994].

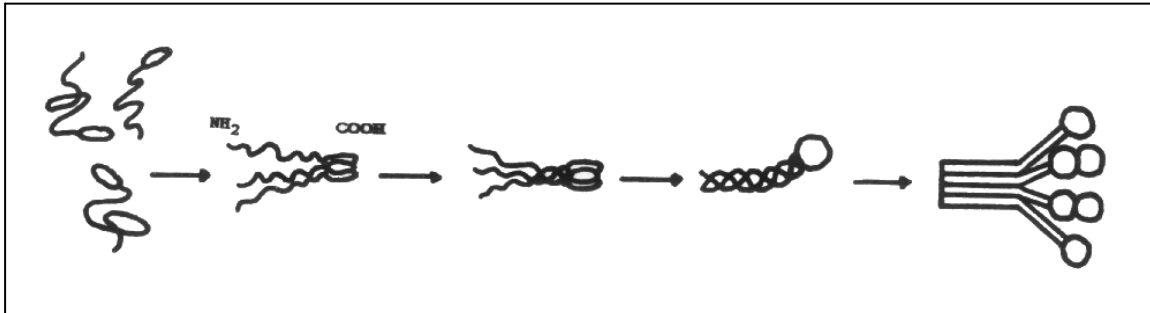


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anordnung mehrerer SP-A-Untereinheiten zu einem Hexamer [modifiziert nach Spissinger et al., 1991]

SP-A kann in vier strukturelle Domänen gegliedert werden: Durch die aminoterminalen Region ist das Monomer in der Lage, intermolekulare Disulfidbrücken auszubilden und ermöglicht so die Oligomerisierung der Monomere untereinander. Eine zentrale kollagenähnliche Domäne mit Triple-Helix-Struktur [King et al., 1989; Haagsman et al., 1989] enthält 23 Gly-X-Y-Triplets, Y steht dabei am häufigsten für 4-Hydroxyprolin [Phelps, Floros, 1988b; Hawgood et al., 1985]. Auf eine hydrophobe „neck“-Region folgt das C-terminale Ende mit der Fähigkeit, Ca^{2+} -abhängig Kohlenhydrate zu erkennen [Haagsman et al., 1990]. Dadurch wird die Bindung an PL, vor allem DPPC, aber auch Sphingomyelin und PC [Kuroki, Akino, 1991a; Kuroki, Akino, 1991c] ermöglicht. Weitere Untersuchungen zeigten, dass SP-A über einen spezifischen Rezeptor Ca^{2+} -abhängig an alveoläre Typ-II-Zellen binden kann, möglicherweise im Rahmen der Regulation des Surfactant-Pools [Kuroki et al., 1988a; Wright et al., 1989], so kann es die Sekretion des Surfactants hemmen und die Wiederaufnahme von PL in die alveoläre Typ-II-Zelle fördern [Dobbs et al., 1987; Rice et al., 1987].

1.3.2.2 Surfactantprotein B

Wie SP-A wird auch SP-B in den alveolären Typ-II-Zellen und in den Clara-Zellen (sekretorische Zellen der distalen Bronchioli) gebildet, die vollständige Prozessierung des Proteins zum maturen Protein findet jedoch ausschließlich in den alveolären Typ-II-Zellen in den verschiedenen Organellen des sekretorischen Weges statt. Das 10 kb umfassende *SFTPB*-Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert [Pilot-Matias et al., 1989;

Vamvakopoulos et al., 1995]. Das Protein besitzt als primäres Translationsprodukt (Prepro-SP-B) eine Molekularmasse von 42 kDa bei einer Primärstruktur von 381 Aminosäuren [Hawgood et al., 1987; Jacobs et al., 1987]. Diese Precursorform findet sich innerhalb der Zelle im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat und in Transportvesikeln. Durch die Abspaltung des Signalpeptids entsteht zunächst ein 39 kDa schweres Protein, welches durch Glykosylierung am C-terminalen Ende weiter prozessiert wird und so wieder ein Molekulargewicht von 42 kDa erreicht. Erst nach mehreren proteolytischen Spaltungen am C- und N-terminalen Ende resultiert das vollständig prozessierte, 8 kDa schwere und oberflächenaktive SP-B, welches innerhalb der Zelle ausschließlich in den multivesikulären und in den Lamellarkörperchen lokalisiert ist [Voorhout et al., 1992; Brasch et al., 2003; Brasch et al., 2004].

Innerhalb der Primärstruktur des vollständig prozessierten SP-B-Proteins aus 79 Aminosäuren, aus denen ein Monomer aufgebaut ist, finden sich sieben Cysteine. Sechs dieser Cysteine bilden intramolekulare Disulfidbrücken, über das siebte Cystein, an Position 48 gelegen, wird mit einem zweiten Monomer eine intermolekulare Disulfidbrücke gebildet [Johansson et al., 1991] (s. Abb. 3).

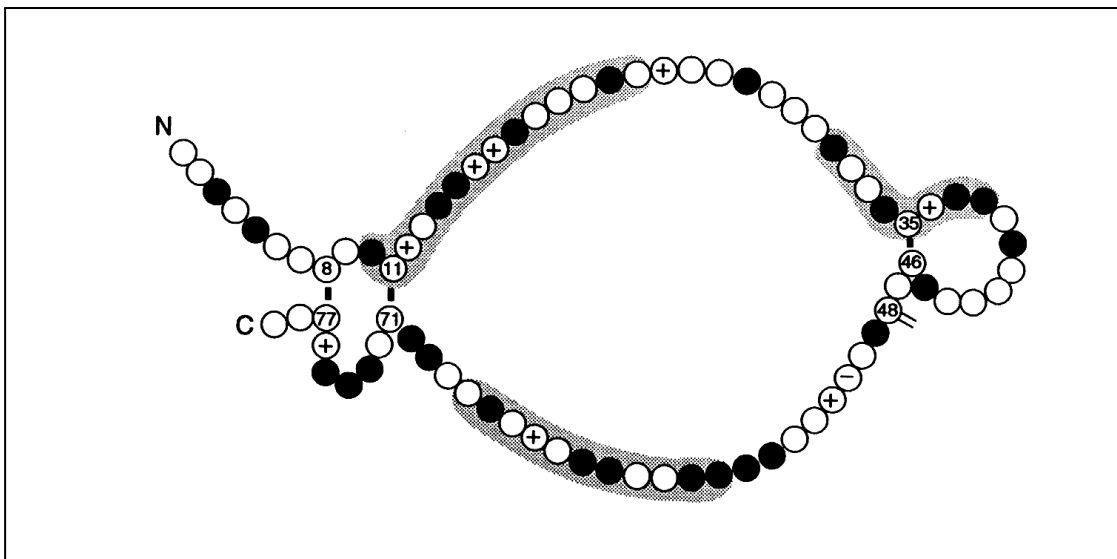


Abbildung 3: Struktur von SP-B [Johansson et al., 1994]

Unter physiologischen Bedingungen liegt SP-B zu über 90 % als ein solches Dimer vor [Revak et al., 1991]. Das Dimer ist ein stark hydrophobes, basisches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 17 kDa, entsprechend dem doppelten Gewicht eines Monomers von ca. 8.5 kDa.

Die proteolytischen C- und N-terminalen Spaltungen vom Vorläuferprotein zum matten SP-B werden durch derzeit drei bekannte Proteasen – Napsin A, Pepsinogen C und Kathepsin H – katalysiert [Ueno et al., 2004; Gerson et al., 2008]. Auf die exakten Spaltstellen der Proteasen bei der Prozessierung des Proproteins wird im Folgenden näher eingegangen:

Napsin A, eine Aspartatprotease, welche zuerst in der Niere beschrieben wurde, findet sich in der Lunge in den alveolären Typ-II-Zellen, den Clara-Zellen und auch in den Lysosomen der Alveolarmakrophagen sowie extrazellulär im Alveolarraum. In der Typ-II-Zelle liegt diese im ER, im Golgi-Apparat, in den multivesikulären und in den Lamellarkörperchen vor. Napsin A ist verantwortlich für die N-terminale Spaltung zwischen Leu¹⁷⁸ und Pro¹⁷⁹ des humanen pro-SP-B-Proteins. Es verbleiben noch 22 Aminosäuren am N-terminalen Ende des matten SP-B und es entsteht ein 25 kDa Intermediat, welches in der Literatur auch oft als „C-pro-SP-B“ bezeichnet wird [Ueno et al., 2004]. Bezüglich einer Beteiligung von Napsin A an Spaltungen am C-terminalen Ende besteht Uneinigkeit [Brasch et al., 2003; Ueno et al., 2004].

Pepsinogen C ist eine weitere Aspartatprotease, die sich in der Lunge, aber auch im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, im Genitaltrakt und in Neoplasien nachweisen lässt. In der Lunge findet sie sich ausschließlich in Typ-II-Zellen, nicht jedoch in Clara-Zellen. Sie scheint unter anderem für die folgenden zwei Spaltungen des C-pro-SP-B-Intermediats zwischen Lys¹⁹⁶ und Ser¹⁹⁷ am aminoterminalen Ende des Proproteins sowie zwischen Met³⁰² und Ser³⁰³ am carboxyterminalen Ende verantwortlich zu sein. Das hieraus entstehende 12 kDa Protein (zwischen Ser¹⁹⁷ und Met³⁰²) enthält das mature SP-B-Peptid sowie einen kleinen, vier Aminosäuren umfassenden aminoterminalen und einen größeren carboxyterminalen Rest. Das Verbleiben des N-terminalen Restes würde noch eine weitere Protease zum Spalten des matten SP-B erfordern [Gerson et al., 2008].

Kathepsin H ist eine Cysteinprotease, welche in der Lunge ausschließlich in den multivesikulären und in den Lamellarkörperchen der Typ-II-Zellen vorliegt. Dieser Protease werden drei wesentliche biologische Aufgaben zugeschrieben: Proenzymaktivierung, Antigenprozessierung und Geweberemodelling. Kathepsin H hat eine Endopeptidase-Aktivität und findet sich in der alveolären Typ-II-Zelle in den Organellen des sekretorischen Weges [Brasch et al., 2002; Bühling et al., 2011]. Der ideale pH-Wert der Kathepsine liegt zwischen 5.5 und 6.8, wie er in den multivesikulären sowie in den Lamellarkörperchen vorliegt [Brasch et al., 2002]. Kathepsin H ist an insgesamt vier Prozessierungsschritten am C-terminalen Ende des C-pro-SP-B-Intermediats beteiligt, wobei die letzte Spaltung zwischen Met²⁷⁹ und Asp²⁸⁰ erfolgt. Hieraus resultiert das am

C-terminalen Ende vollständig prozessierte mature SP-B. Zusätzlich wird auch am N-terminalen Ende des 25 kDa C-pro-SP-B-Intermediats eine Beteiligung von Kathepsin H beschrieben (zwischen Ala¹⁸⁷ und Arg¹⁸⁸), die Spaltstelle liegt zwischen der von Napsin A und der von Pepsinogen C [Ueno et al., 2004].

Die Abbildung 4 stellt das Protein mit den beteiligten Proteasen und den entsprechenden Spaltstellen schematisch dar.

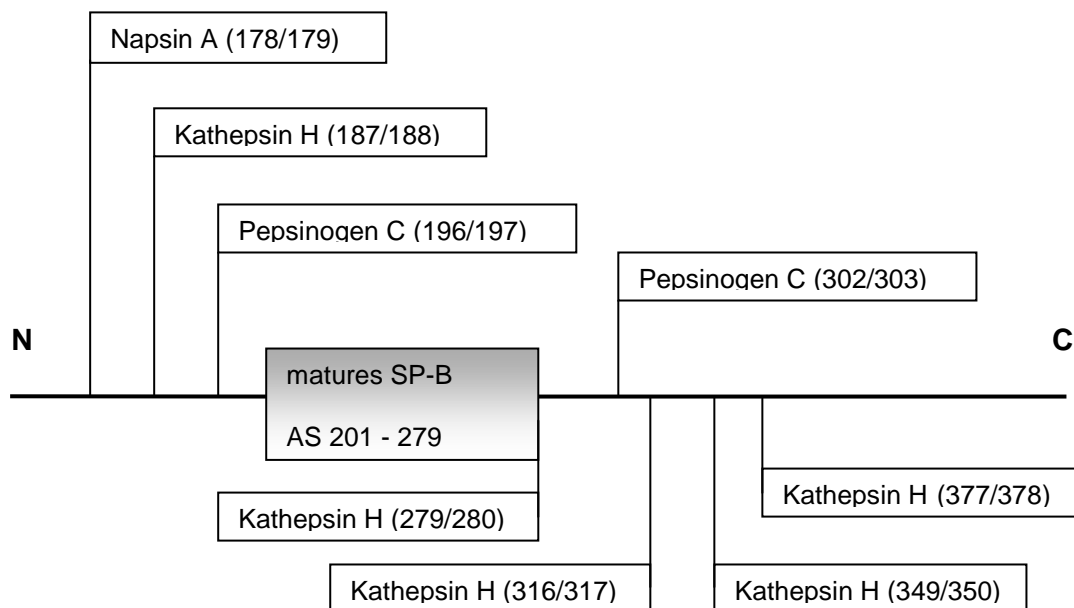


Abbildung 4: Spaltstellen der bei der Prozessierung des Surfactantprotein B beteiligten Enzyme Napsin A, Pepsinogen C und Kathepsin H [modifiziert nach Ueno et al., 2004]

AS = Aminosäure

Sobald eines dieser drei Enzyme reduziert vorliegt, sinkt die Produktion von maturem SP-B [Guttentag, 2008; Ueno et al., 2004; Gerson et al., 2008]. Bei Kathepsin H-*knock-out*-Mäusen lassen sich reduzierte Spiegel an SP-B in der bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie eine eingeschränkte Fähigkeit zur Reduktion der alveolären Oberflächenspannung zeigen [Bühling et al., 2011].

Eine Übersicht über die Prozessierungsschritte und ihre Lokalisation in der Zelle ist in Abbildung 5 gezeigt.

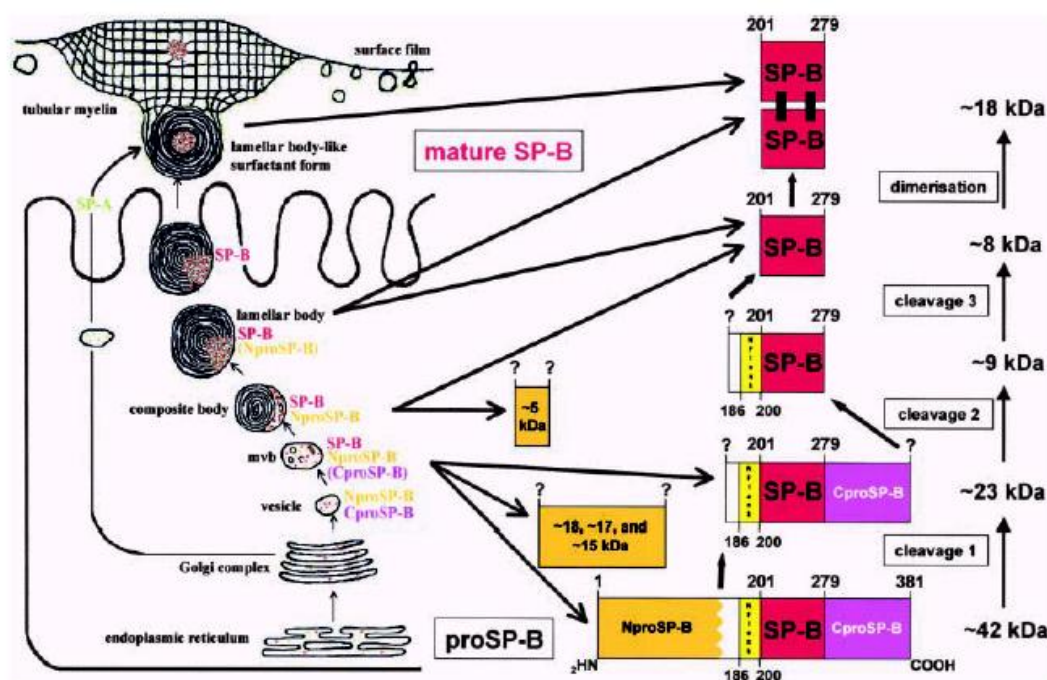


Abbildung 5: Prozessierungsschritte von pro-SP-B zum maturen SP-B, welches als Dimer sezerniert wird [modifiziert nach Brasch et al., 2002]

mvb = multivesicular bodies/multivesikuläre Körperchen

1.3.2.3 Surfactantprotein C

Das Surfactantprotein C wird als einziges der vier Surfactantproteine ausschließlich in den alveolären Typ-II-Zellen synthetisiert [Phelps, Floros, 1988a; Kalina et al., 1992]. Es sind zwei sehr ähnliche *SFTPC*-Gene auf Chromosom 8 lokalisiert [Glasser et al., 1988b], die aus sechs Exons (I bis V kodierend, Exon VI wird nicht übersetzt) bestehen. Das primäre Translationsprodukt ist ein Transmembranprotein aus 197 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21 kDa [Glasser et al., 1988a; Glasser et al., 1988b; Fisher et al., 1989]. Dieses Proprotein ist mit der maturen SP-C-Region im Lipidlager von Membranen verankert, wobei das NH₂-Ende zum Zytosol und der COOH-Rest zum Lumen gelegen ist. Während des Transports vom ER zu den Lamellarkörperchen ist SP-C weiterhin in Membranen verankert; die verschiedenen Prozessierungsschritte finden sequentiell an den extramembranösen Regionen statt [Wang et al., 2002].

Durch vier Prozessierungsschritte über SP-C-Intermediate mit den Molekulargewichten von 16, 7 und 6 kDa entsteht schließlich das vollständig prozessierte 4,2 kDa schwere mature SP-C. Dabei erfolgen jeweils zwei Spaltungen am C-terminalen Ende mit der Entfernung von 136 Aminosäuren, anschließend zwei Spaltungen an der N-terminalen

Domäne mit Abtrennung von 23 Aminosäuren. An der Prozessierung des 21 kDa pro-SP-C ist, wie schon bei SP-B, die lysosomale Cysteinprotease Kathepsin H beteiligt. Sie katalysiert die erste proteolytische Abspaltung am aminoterminalen Ende des pro-SP-C-Intermediats und damit den dritten Schritt in der SP-C-Prozessierung [Brasch et al., 2002]. Die Proteasen, die für die ersten beiden Abspaltungen am C-Terminus sowie für den letzten N-terminalen Prozessierungsschritt des SP-C-Proteins verantwortlich sind, sind weitgehend unbekannt. Auf Fachkongressen wurden Forschungsergebnisse präsentiert, die eine Beteiligung von Napsin A und Pepsinogen C nicht nur an der SP-B- sondern auch an der SP-C-Prozessierung vermuten lassen [Brasch et al., 2001; Kotorashvili et al., 2009].

Die posttranslationalen Modifikationen des Proteins beinhalten weiterhin die Kopplung von zwei Palmitinsäureresten über Thioesterverbindungen. Das mature SP-C besteht nach vollständiger Prozessierung aus 35 Aminosäuren (den Aminosäuren 24 - 58) und liegt dipalmitoyliert vor [Stults et al., 1991]. Dadurch gehört es zu den kleinsten und hydrophobesten natürlich vorkommenden Proteinen überhaupt. Es besteht aus einer Transmembrandomäne und einem 10 Aminosäuren umfassenden extramembranösen Rest und liegt als Monomer vor [Curstedt et al., 1990].

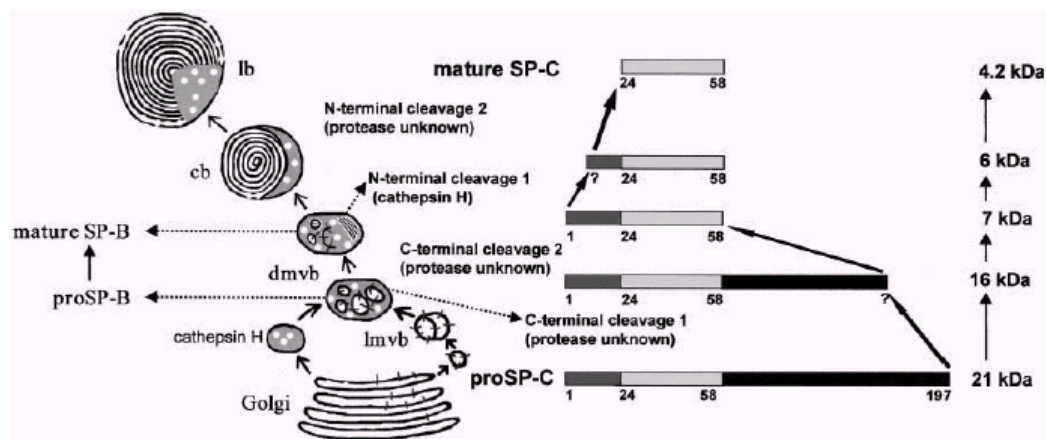


Abbildung 6: Prozessierungsschritte von pro-SP-C zum murenen Protein [Brasch et al., 2002]

Imvb = *electron-light vesicles* bzw. *multivesicular bodies*; dmvb = *dense multivesicular bodies*/ multivesikuläre Körperchen; cb = *composite bodies*; lb = *lamellar bodies*/Lamellarkörperchen

1.3.2.4 Surfactantprotein D

SP-D ist ein hydrophiles Glykoprotein, das in den Typ-II- und Clarazellen synthetisiert wird [Persson et al., 1989; Kuroki et al., 1991b; Madsen et al., 2000]; darüber hinaus wird es in vielen extrapulmonalen Organen wie Trachea, Herz, Niere, Gehirn, Pankre-

as, Magen und Darm exprimiert [Madsen et al., 2000]. Das primäre Translationsprodukt besitzt ein Molekulargewicht von 39.3 - 42 kDa, die Sequenz des endgültigen Proteins umfasst 355 Aminosäuren [Lu et al., 1992; Crouch et al., 1994a].

SP-D wird in vier strukturelle Regionen gegliedert: Am aminoterminalen Ende des Proteins findet sich innerhalb von 25 Aminosäuren zweimal Cystein. Ein kollagenartiger Mittelteil umfasst 177 Aminosäuren mit 59 kontinuierlichen Gly-X-Y-Triplets. Auf eine kurze „neck“-Region folgt C-terminal der Kohlenhydrat-erkennende hydrophile Bereich mit 153 Aminosäuren [Rust et al., 1991; Persson et al., 1990; Lu et al., 1992]. Wie auch SP-A kann SP-D Ca^{2+} -abhängig Kohlenhydrate binden.

SP-D wird als Trimer sezerniert und durch Disulfidbrücken stabilisiert, physiologisch liegt es als Verknüpfung von vier Trimeren vor und erhält damit ein Molekulargewicht von 516 kDa [Crouch et al., 1994a; Crouch et al., 1994b].

Über einen längeren Zeitraum wurde eine Surfactant-spezifische Funktion des Proteins angezweifelt und ihm statt dessen eine ausgeprägte immunmodulierende Eigenschaft zugesprochen. Bei SP-D-*knock-out* Mäusen konnte jedoch eine Störung der Surfactant-Homöostase, mit Akkumulation des Surfactant in den Alveolen, gezeigt werden [Korfhagen et al., 1998].

1.4 Der Metabolismus des pulmonalen Surfactants

1.4.1 Synthese und Speicherung

Die Synthese der Phospholipide und der Surfactantproteine findet im ER der alveolären Typ-II-Zellen der Lunge statt [Chevalier, Collet, 1972; Massaro, Massaro, 1972]. Von dort aus gelangen sie über den Golgi-Apparat in die multivesikulären Körperchen. Anschließend werden die reifen Surfactantbestandteile in den Lamellarkörperchen gesammelt. Die Lamellarkörperchen oder *lamellar bodies* sind spezialisierte, Lysosom-ähnliche Organellen und finden sich in alveolären Typ-II-Zellen, aber auch im extrazellulären Alveolarraum. Dabei enthalten sie sowohl die verschiedenen Phospholipide als auch die Surfactant-spezifischen Proteine sowie Glycosaminoglykane und lysosomale Enzyme.

1.4.2 Freisetzung und Wiederaufnahme

Die Sekretion der Surfactantbestandteile aus den Typ-II-Zellen in die Alveolen erfolgt über Exozytose der Lamellarkörperchen. In Ruhe werden so pro Stunde ca. 10 % des

DPPC-Gehaltes aller Lamellarkörperchen in den Alveolarraum freigesetzt [Crystal et al., 1991]. Als wichtigster physiologischer Anreiz zur Surfactantsekretion gilt die mechanische Dehnung der alveolären Typ-II-Zellen durch tiefe Inspiration [Nicholas, Barr, 1983; Oyarzun et al., 1980]. Daneben sind auch verschiedene Mediatoren zur Steigerung der Surfactantfreisetzung fähig (Leukotriene, Prostaglandine [Gilfillan, Rooney, 1985; Rooney et al., 1988], β -Sympathomimetika [Rooney, 1985; Ballard, 1989]). SP-A selbst scheint ein konzentrationsabhängiger Inhibitor der Surfactantausschüttung im Sinne einer negativen Rückkopplung zu sein [Dobbs et al., 1987; Kuroki et al., 1988b; Rice et al., 1987]. Einen besonderen Stellenwert haben Glukokortikoide: Ihre Fähigkeit zur Steigerung von Synthese und Sekretion aller Surfactantbestandteile wird als medikamentöse Therapie bei drohender Frühgeburt zur Vermeidung eines *infant respiratory distress syndrom* (IRDS) genutzt [Wright, Clements, 1987; Cosmi, Di Renzo, 1989].

Der größte Teil der sezernierten Surfactantbestandteile bildet in dem Flüssigkeitsfilm auf der epithelialen Oberfläche des Alveolarraumes eine dreidimensionale, gitterartige Struktur aus, das so genannte tubuläre Myelin [Williams, 1977]. Es stellt den Vorläufer des eigentlichen Oberflächenfilmes dar.

Um eine Akkumulation von Surfactantmaterial im alveolären Raum zu verhindern, werden die einzelnen Bestandteile drei bisher bekannten Abbauwegen zugeführt: Die Wiederaufnahme in die Typ-II-Zelle (als Hauptanteil [Wright et al., 1986; Jacobs et al., 1985a; Jacobs et al., 1985b; Magoon et al. 1983]), der Abbau in Alveolarmakrophagen und der Abtransport entlang der Atemwege (mukoziliare Clearance).

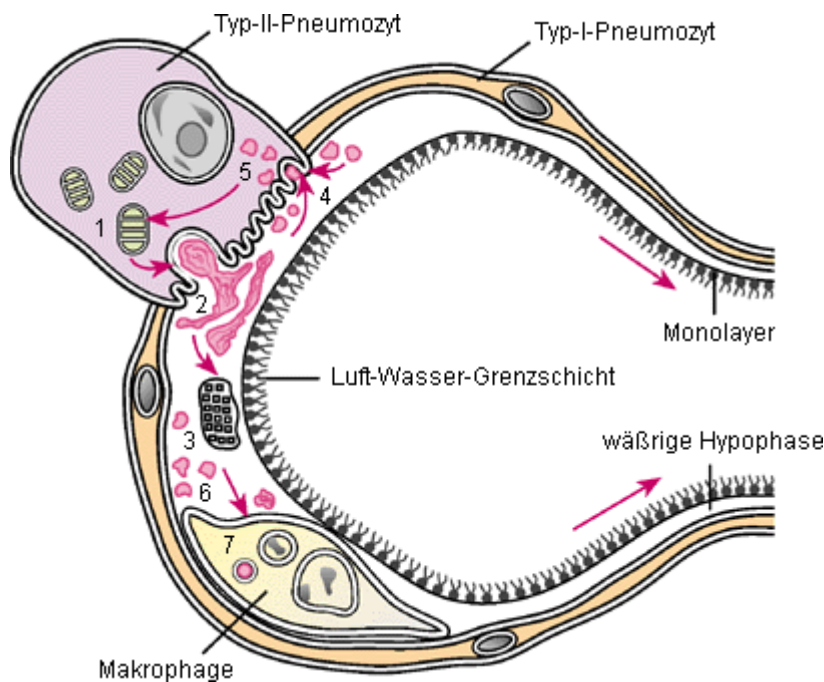


Abbildung 7: Alveole mit schematischer Darstellung des Surfactant-Stoffwechsels [modifiziert nach Hawgood, Clements, 1990]

1 = Speicherung von Surfactant in den Lamellarkörperchen; 2 = Exozytose von Surfactant in die wässrige Hypophase; 3 = tubuläres Myelin; 4 und 6 = verbrauchter Surfactant in der wässrigen Hypophase; 5 = Rückresorption von verbrauchtem Surfactant zum Recycling; 7 = Aufnahme von Surfactant von einer Makrophage

1.5 Die Funktionen des pulmonalen Surfactants

1.5.1 Reduzierung der Oberflächenspannung

Das pulmonale Surfactant bedeckt als Lipoproteingemisch die alveoläre Luft-Wasser-Grenzfläche und gewährleistet so die Reduzierung der Oberflächenspannung auf Werte nahe 0 mN/m. Eine bedeutende Rolle spielen dabei die Phospholipide. Durch ihre amphiphilen Eigenschaften (die Phosphatgruppe als hydrophiler Kopfteil, die langkettigen Fettsäuren als hydrophober Schwanzteil) können sie membranöse Strukturen in Form von Monolayern an Luft-Wasser-Grenzflächen, wie man sie in den Lungenbläschen findet, ausbilden. Die für eine größtmögliche Reduktion der Oberflächenspannung optimalen biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften bietet Dipalmitoylphosphatidylcholin. Der dichte DPPC-Film besitzt in Endexpiration, also in maximaler Kompression der Alveolen, eine hohe Stabilität; die Moleküle entweichen nicht aus dem Grenzflächenfilm. Dies gilt als Grundlage zum Erreichen einer niedrigen Oberflächenspannung. Die mit ungesättigten Fettsäuren veresterten Phosphatidylcholone zeigen dagegen eine erhöhte Mobilität. Wenn also während der Inspiration die Oberfläche der Alveolen zunimmt, wird der Surfactant-Film mit diesem „mobilen“ oberflächenaktiven Material gespeist (*reentry*), während bei der Expiration

diese Phospholipide wieder herausgequetscht werden, dies wird als *squeeze-out* bezeichnet [Possmayer, 1990; Possmayer, 1991; Harwood, 1987a; Harwood, 1987b].

Ein reiner Phospholipidfilm wäre ohne Beteiligung der Surfactantproteine nicht in der Lage, eine ausreichende biophysikalische Aktivität zu erreichen [Notter et al., 1987; Revak et al., 1988]. Vor allem die hydrophoben Surfactantproteine B und C beeinflussen unter anderem über elektrostatische Wechselwirkungen die Funktionalität des Phospholipidfilms und verbessern so seine biophysikalischen Eigenschaften durch Erleichterung der Ausbreitung, Adsorption und Stabilität [Cochrane, Revak, 1991; Yu, Possmayer, 1992]. SP-B ist extrazellulär an der Anlagerung der PL in den sich dehrenden Surfactantfilm und der Formierung und Aufrechterhaltung des tubulären Myelins beteiligt [Whitsett, Weaver, 2002]. Der Ausfall dieses Surfactantproteins führt zum Verlust von biophysikalischer Aktivität und dadurch zu einer Verschlechterung der Oberflächenaktivität [Veldhuizen et al., 1993], weiterhin aber auch zu einer Verlangsamung in der Ausbildung des Phospholipidmonolayers und damit zu einer verzögerten Reduktion der Oberflächenspannung [Tanaka et al., 1986]. SP-C dient als eine Art „Anker“ und interagiert Ca^{2+} -abhängig zwischen dem Phospholipidmonolayer und der wässrigen Interphase [Bi et al., 2002; Pastrana et al., 1991].

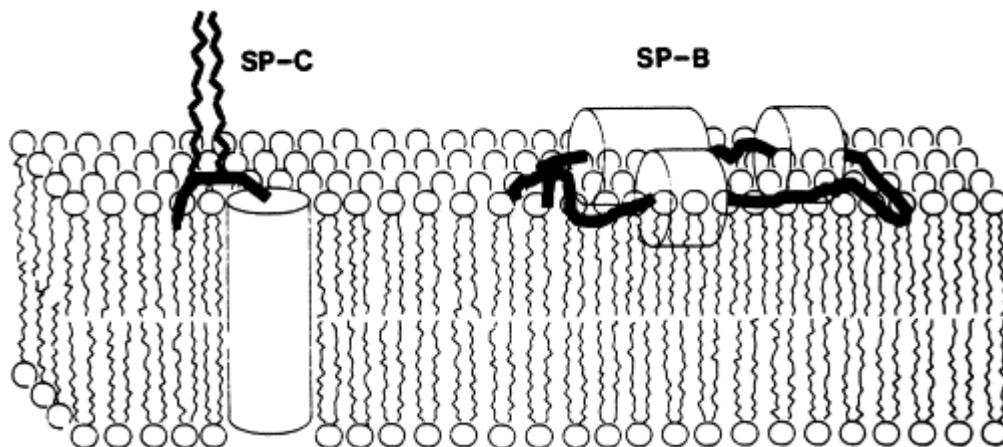


Abbildung 8: Interaktion der hydrophoben Surfactantproteine B und C mit den Phospholipiden [Possmayer et al., 2001]

Dieses komplexe Zusammenspiel verschiedener Bestandteile ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der unterschiedlich großen Alveolen. Nur durch ein Absinken der Oberflächenspannung vor allem in kleinen Alveolen kann deren endexpiratorischer Kollaps vermieden werden, was zu einer Umverteilung des Volumens zuguns-

ten der großen Alveolen und damit zu einer aerodynamisch ungleichen und damit ungünstigen Verteilung der Atemluft führen würde.

1.5.2 Bedeutung für den Gasaustausch

Für die wässrig ausgekleideten Alveolen gilt das Gesetz nach Laplace: $\Delta p = 2\gamma/r$ (p : Druck, γ : Oberflächenspannung, r : Radius). Auf die Physiologie der Lunge übertragen kann man herleiten, dass eine Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung deren Kollaps vor allem in End-Expirationsstellung, also bei kleiner werdendem Radius, begünstigt. Dies würde zu einer Vergrößerung des Durchmessers größerer Alveolen führen, da nach Laplace der Radius r zunehmen muss, um Δp konstant zu halten. Damit lägen physiologisch ungünstige Verhältnisse vor, denn einige Lungenbläschen wären kollabiert, andere überbläht.

Weiterhin trägt der Surfactantfilm entsprechend dem Laplace'schen Gesetz zur Dehnbarkeit der Lunge bei (Compliance $C = \Delta V \text{ Volumen} / \Delta P \text{ Druck}$). Lägen nämlich zu Beginn der Inspiration kollabierte Alveolen vor, müssten diese sich erst öffnen. Dies könnte nur durch einen erhöhten Inspirationsdruck erreicht werden. Störungen im Surfactant-System, die also zu einer erhöhten Oberflächenspannung führen, tragen demzufolge nicht nur zu einem reduzierten Durchmesser bis hin zum Kollaps der Alveole bei Expiration bei, sondern führen auch zu einer Abnahme der Compliance.

1.5.3 Immunregulatorische Effekte

Die gleichmäßige Auskleidung der Alveolenoberfläche mit Surfactant verhindert rein mechanisch schon die Adhäsion und Invasion pathogener Keime mit dem Epithel. Ferner schützt es das empfindliche Epithel vor Sauerstoffradikalen durch die Neutralisation von Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und erleichtert durch seine viskösen Eigenschaften den mucoziliären Transport [Gehr et al., 2000]. Über verschiedene Mechanismen wirken die einzelnen Surfactantbestandteile weiterhin direkt bei der pulmonalen Immunabwehr mit: Dazu gehört die Unterstützung der unspezifischen Abwehr, weiterhin eine Immunmodulation der Lymphozyten und die Verstärkung der Aktivität von Alveolarmakrophagen [Ahuja et al., 1996; Hamm et al., 1996]. Die wichtigste Rolle spielen hierbei SP-A und SP-D, die als antimikrobielle Peptide zur ungerichteten humoralen Infektabwehr der Lunge zählen. Sie regulieren Phagozytose, Chemotaxis und Lyse von Mikroorganismen und sind zur Opsonisierung fähig. Zusätzlich können beide Proteine bakterielle Toxine direkt binden und sie auf diesem Weg inaktivieren

[Hamm et al., 1996; Wright, 1997; Crouch, Wright, 2001]. Die PL, v. a. PC, PG und PI unterdrücken Proliferation, Immunglobulin-Produktion und Zytotoxizität von Lymphozyten. Außerdem inhibieren sie die Endotoxin-stimulierte Zytokin-Freisetzung (Tumornekrosefaktor TNF, Interleukin-1, Interleukin-6) von Makrophagen [Ansfield et al., 1980; Catanzaro et al., 1988; Speer et al., 1991; Thomassen et al., 1992].

1.6 Die Idiopathische Pulmonale Fibrose als Form einer ILD

Als interstitielle Lungenerkrankung (ILD) oder auch diffus parenchymatöse Lungenerkrankung (DPLD) wird eine Gruppe von über 100 verschiedenen Erkrankungen bezeichnet, die das Lungeninterstitium sowie die alveolo-kapilläre Membran betreffen. Sie können infolge von Systemerkrankungen (Kollagenosen, Vaskulitiden) auftreten, durch Medikamente (z. B. Bleomycin, Amiodaron) verursacht sein oder aufgrund einer Inhalation von verschiedenen Noxen (Asbest, Allergene) entstehen. Bei vielen Patienten mit Lungenparenchymdestruktionen ist die Ursache jedoch unbekannt. Dazu zählt man vor allem die sogenannten Idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP). Diese werden nach der Klassifikation der American Thoracic Society (ATS) und der European Respiratory Society (ERS) aus dem Jahr 2002 in sieben verschiedene Entitäten eingeteilt: Neben der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) als der häufigsten Form sind dies noch die nicht-spezifische interstitielle Pneumonie mit den zwei Subtypen des zellulären und des fibrosierenden Typs (NSIP), die Kryptogen organisierende Pneumonie (COP oder Bronchiolitis obliterans organisierende Pneumonie, BOOP), die Akute interstitielle Pneumonie (AIP = früher auch Hamman-Rich-Syndrom), die respiratorische Bronchiolitis-ILD (RB-ILD), die Desquamative interstitielle Pneumonie (DIP) und die Lymphoide interstitielle Pneumonie (LIP) [American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002].

Die IPF stellt insgesamt die größte Gruppe innerhalb der IIP dar und ist zusammen mit der fibrosierenden NSIP die zweithäufigste Form einer ILD überhaupt. Sie wird dabei von der Internationalen ATS/ERS-Konsensuskonferenz aus dem Jahr 2011 als eine chronische, progressiv verlaufende und fatale fibrosierende interstitielle Pneumonie unklarer Genese definiert, die ältere Erwachsene betrifft, auf die Lungen begrenzt und mit dem histologischen oder radiologischen Muster eines *usual interstitial pneumonia* (UIP) verknüpft ist. Um die Diagnose einer IPF stellen zu können, müssen bekannte Gründe für eine ILD ausgeschlossen werden. Die im Jahr 2000 von der Konsensuskonferenz definierten Haupt- sowie Nebenkriterien zur Diagnostik einer IPF sind 2011 aktualisiert worden.

Die Erkrankung kann in drei Krankheitsverläufen auftreten: Langsam progredient verlaufend (am häufigsten), als schneller progressiver Verlauf oder aber gekennzeichnet durch langstreckige stabile Phasen mit wiederholten akuten Exazerbationen [Kim et al., 2006a; Ley et al., 2011]. Exazerbationen sind dabei definiert als rasche Zunahme der Symptome (von einigen Tagen bis zu wenigen Wochen), eine Verschlechterung der Lungenfunktion sowie zusätzliche radiologische Veränderungen wie Milchglasmuster und Konsolidationen ohne Hinweis auf Infekte, Embolien oder andere greifbare Ursachen [Ley et al., 2011].

Bei allen Patienten kommt es zu einer progredienten Zerstörung der alveolären Lungenstruktur und deren Ersatz durch fibrotisches Bindegewebe. Daraus resultieren eine Zunahme der alveolo-kapillären Diffusionsstrecke, ein Verlust an regelhaft ausgebildeter Gasaustauschfläche sowie eine durch die Bindegewebsvermehrung hervorgerufene Reduzierung der Lungendehnbarkeit (*Compliance*). Klinisch beobachtet man initial eine Belastungsdyspnoe, die fortschreitet und später zu Ruhe- und Tachypnoe führt. Typisch ist auch ein trockener Reizhusten. Im fortgeschrittenen Stadium beobachtet man Zeichen der Hypoxie (Zyanose, Trommelschlegelfinder, Uhrglasnägel) sowie ein Cor pulmonale als Zeichen der rechtsseitigen kardialen Belastung. Auskultatorisch findet sich ein inspiratorisches Knisterrasseln (Sklerosiphonie) vor allem in den basalen Lungenabschnitten, welches am ehesten durch die Wiedereröffnung zuvor kollabierter Alveolen entsteht.

Viele Patienten sind im Verlauf ihrer Erkrankung aufgrund der oft ausgeprägten Hypoxämie bei respiratorischer Partialinsuffizienz auf eine Sauerstoffsubstitution angewiesen. Ein Fortschreiten der Erkrankung kann dadurch nicht vermieden werden.

1.6.1 Diagnose einer IPF

Von den ersten Symptomen bis zur endgültigen Diagnosestellung vergehen in der Regel ein bis zwei Jahre, gelegentlich kann die IPF auch einige Jahre asymptomatisch bleiben [Ley et al., 2011]. Zu Beginn der Diagnostik stehen eine ausführliche Anamnese, die den Verdacht auf eine fibrosierende Lungenerkrankung mit bekannter Ätiologie erhärten kann, eine körperliche Untersuchung, eine Röntgen-Thoraxaufnahme in zwei Ebenen und eine Lungenfunktionsprüfung. Diese kann eine Restriktion mit Abnahme der totalen Lungkapazität und Vitalkapazität bei normalem Tiffeneau-Quotienten als Zeichen der reduzierten Lungencompliance aufdecken. Durch Blutgasanalysen in Ruhe und bei Belastung kann eine eventuell vorliegende Hypoxie (als Ausdruck einer gestörten Ventilation/Perfusionsverteilung) nachgewiesen werden. Die Messung des

Transferfaktors für CO gilt, aufgrund der bei der IPF vorliegenden verlängerten Diffusionsstrecke, als sensitivster Parameter für den Nachweis einer gestörten Diffusionskapazität. Zum Ausschluss einer Autoimmunerkrankung mit pulmonaler Beteiligung (Kollagenose, rheumatoide Arthritis) sollte zudem ein Autoantikörper-Screening erfolgen. Bei Patienten mit begründetem Verdacht auf das Vorliegen einer Idiopathischen interstitiellen Pneumonie sollte eine hochauflösende Thorax-Computertomographie (*High Resolution* Computertomographie HR-CT) durchgeführt werden. Bei der IPF findet sich typischerweise ein als radiologisches UIP-Muster bezeichnetes Bild mit retikulärer Zeichnungsvermehrung sowie Honigwaben (*Honeycombing*) mit subpleuraler und basaler Betonung, Traktionsbronchiektasen können zusätzlich zu finden sein. Gemäß dem aktuellen ATS/ERS-Statement sind folgende radiologische Befunde nicht mit einem UIP-Muster vereinbar: peribronchovaskuläre Betonung, Zysten, ausgeprägtes Milchglasmuster oder Konsolidationen [Raghu et al., 2011]. Als Differentialdiagnose bei einem radiologischen UIP-Muster muss an eine Lungenbeteiligung bei einer Kollagenose, vor allem der rheumatoiden Arthritis [Kim et al., 2009], an Asbestose [Copley et al., 2003] und die Exogen Allergische Alveolitis (EAA) [Shigemitsu, Azuma 2011] gedacht werden. Prinzipiell wird empfohlen, die Diagnose im Rahmen einer interdisziplinären Konferenz von Radiologen, Pathologen und Pneumologen zu stellen [Raghu et al., 2011].

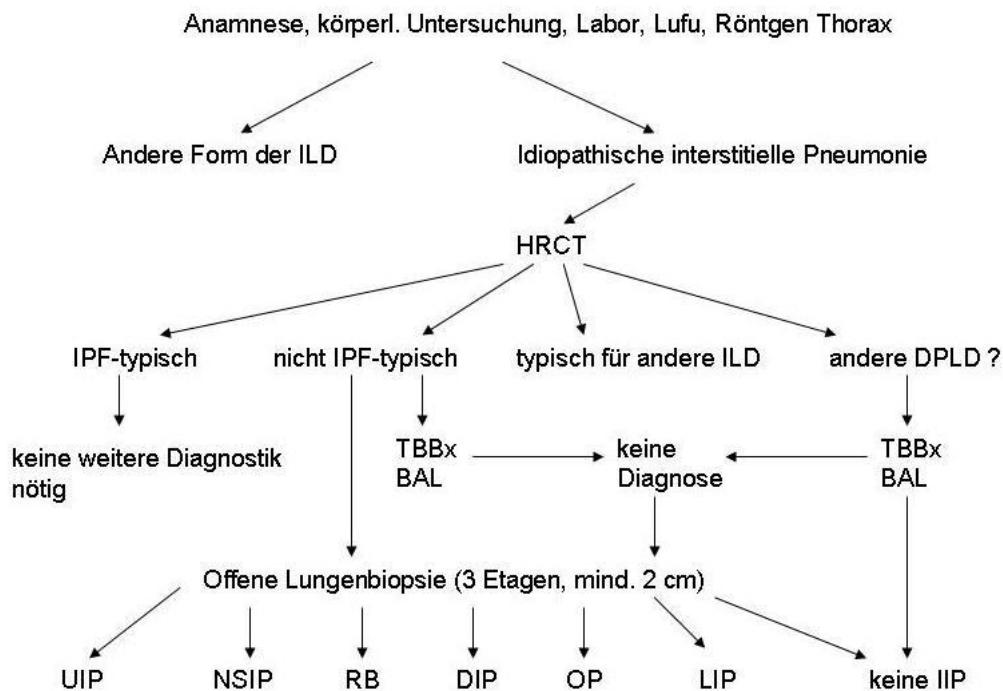


Abbildung 9: Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine Idiopathische interstitielle Pneumonie [Günther et al., 2003, modifiziert nach Raghu et al., 2011]

Lufu = Lungenfunktion; ILD = interstitielle Lungenerkrankung; HRCT = hochauflösende Computertomographie; IPF = Idiopathische Pulmonale Fibrose; DPLD = Diffus parenchymatöse Lungenerkrankung; TBBx = transbronchiale Biopsie; BAL = bronchoalveoläre Lavage; UIP = *usual interstitial pneumonia*; NSIP = nicht-spezifische interstitielle Pneumonie; RB = respiratorische Bronchiolitis; DIP = Desquamative interstitielle Pneumonie; OP = organisierende Pneumonie; LIP = Lymphoide interstitielle Pneumonie; IIP = Idiopathische interstitielle Pneumonie

Bei passender Anamnese und Klinik sowie einem typischen UIP-Muster im HR-CT kann die Diagnose einer IPF gestellt und auf weitere invasive Diagnostik verzichtet werden. Oft wird zur Diagnosesicherung jedoch noch eine bronchoskopische Untersuchung angeschlossen, vor allem zur Gewinnung einer BAL und zur Durchführung einer transbronchialen Biopsie zur weiterführenden Differenzierung zwischen einer IPF und einer anderen IIP. Die BAL bei IPF-Patienten weist in der Regel eine Vermehrung der neutrophilen Granulozyten auf, gelegentlich einhergehend mit einer leichten Eosinophilie. Bei radiologisch nicht eindeutigem UIP-Muster wird eine pathologische Sicherung mittels Video-assistierter Thorakoskopie (VATS) angestrebt, in der der pathologische Nachweis eines UIP-Musters gefordert ist. Ein pathologisches UIP-Muster bedeutet dabei das Auftreten von Arealen mit normaler Lungenhistologie im Wechsel mit Arealen dichter Fibrose mit Vernarbungen und Honigwaben. Typisch ist zudem das Auftreten von Bereichen mit proliferierenden Fibroblasten, sogenannte Fibroblastenfoci [Enomoto et al., 2006; Raghu et al., 2011].

Pathologisch veränderte standardmäßig bestimmte Laborbefunde treten bei der IPF nicht auf.

1.6.2 Epidemiologie und Sozioökonomische Bedeutung

Die Prävalenz und Inzidenz interstitieller Lungenerkrankungen wurde in einer populationsbasierenden Studie in den USA im Jahr 2006 mit einer Prävalenz der IPF von 42,7 pro 100 000 Einwohner angegeben (bei strengeren Einschlusskriterien 14 pro 100 000), die Inzidenz mit 16,3 pro 100 000 (bzw. 6,8 pro 100 000) [Raghu et al., 2006], wobei die Inzidenz in den letzten Jahren zugenommen hat und insgesamt mehr Männer als Frauen betroffen sind [Meltzer, Noble, 2008; Gribbin et al., 2006]. Europäische Untersuchungen von 2003 zeigten einen Anteil von 20 bis 30 % der IPF bei ILD [Schweisfurth et al., 2003] sowie eine Prävalenz von 16 - 18 pro 100 000 [Yi et al., 2002]. Bei einer medianen Überlebenszeit von zwei bis fünf Jahren nach Diagnosestellung [Meltzer, Noble, 2008] muss man also allein in Deutschland von bis zu 50 000 Patienten, innerhalb der EU von 315 000 und weltweit von 5 Millionen Patienten ausgehen, die an einer interstitiellen Lungenerkrankung leiden [Meltzer, Noble, 2008; Günther et al., 2012]. Die Erkrankung tritt meist zwischen dem fünften und siebten Lebensjahrzehnt auf, das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 66 Jahren.

Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer IPF gelten Rauchen sowie ein gastroösophagealer Reflux, als prognostisch günstig dagegen ein jüngeres Alter bei Diagnosestellung, weibliches Geschlecht sowie ein Nieraucherstatus [Ley et al., 2011; Antoniou et al., 2007]. Häufige und prognostisch ungünstige Komorbiditäten sind eine pulmonale Hypertonie sowie ein Emphysem (*combined pulmonary fibrosis and emphysema* CPFE), die häufigste Todesursache der Patienten ist in der Regel eine Progression der Lungenfibrose. Oft letal verlaufende Begleiterkrankungen sind die ischämische Herzerkrankung mit Herzversagen, Bronchialkarzinome, Infektionen und pulmonalarterielle Embolien [Ley et al., 2011]. Bronchialkarzinome treten bei bis zu 38 % der Fälle auf, insbesondere bei rauchenden Patienten und sind typischerweise peripher und in den Unterlappen lokalisiert [Bouros et al., 2002].

1.7 Pathomechanistische Konzepte zur Entwicklung einer IPF

Für einige Formen der ILD wird ein primär entzündlicher Trigger der Lungenfibrose angenommen. Dies gilt vor allem für die EAA und die Sarkoidose. Bei sicherer Allergenkarenz und/oder adäquater Therapie mit Steroiden und Immunsuppressiva ist eine Besserung oder sogar eine Restitutio ad integrum möglich.

Auch für die IIP wurde lange Zeit ein primärer Entzündungsmechanismus als Auslöser angesehen. Diese Annahme basierte auf direkten (lymphozytäre oder neutrophile Al-

veolitis, vermehrte Expression von Chemokinen und Zytokinen) und indirekten (mediastinale Lymphknotenvergrößerungen) Entzündungszeichen bei IPF- und NSIP-Patienten [Strieter, 2005]. Die bei entzündlichen Erkrankungen typischerweise angewandte Therapie aus Steroiden und Immunsuppressiva (Azathioprin oder Cyclophosphamid), die auch von der im Jahr 2000 abgehaltenen Konsensuskonferenz noch als Therapiekonzept für die IPF empfohlen wurde [American Thoracic Society, 2000], kann den Verlauf der Erkrankung jedoch nicht wesentlich beeinflussen [Selman et al., 2001; Gross, Hunninghake, 2001; Pardo, Selman, 2002]. Nicht zuletzt deshalb wurde ein entzündlich bedingter Mechanismus in Frage gestellt.

1.7.1 Die epitheliale Apoptose und der ihr zugrunde liegende ER Stress als möglicher Auslöser einer IPF

Aus zellbiologischer, molekularbiologischer und pathologischer Sicht geht man heute nicht mehr von einer primären Entzündung als Ursache der Fibrose aus, sondern von einer repetitiven Schädigung des Alveolarepithels und einer dadurch inflammatorisch allenfalls modulierten Fibrosierungsreaktion [Selman et al., 2001; Pardo, Selman, 2002; Selman, Pardo, 2006]. Die Auslöser für die Schädigung des Alveolarepithels sind dabei vielfältig. Postuliert werden neben endogen, noch zu definierenden Faktoren, unter anderem Zigarettenrauchen, Mikroaspirationen aufgrund von gastroösophagealem Reflux, Viruserkrankungen und inhalative chemische Noxen [Fahim et al., 2011]. Von großer Bedeutung ist die Beobachtung, dass bestimmte familiäre Formen der IPF auf Mutationen der Surfactantproteine, lysosomaler Cargo-Proteine, Lipid-Transporter oder des Telomerasekomplexes zurückgeführt werden können [Wang et al., 2009; Weichert et al., 2011; Thomas et al., 2002; Mulugeta et al., 2005; Maitra et al., 2010]. Interessanterweise sind von diesen Mutationen fast ausnahmslos die alveolären Typ-II-Zellen (AECII) betroffen, da zum Teil nur in diesen Zellen diese Proteine exprimiert und synthetisiert werden. Die Schädigungen der alveolären Epithelzellen führen dabei zur Apoptose, dem programmierten Zelltod aufgrund fehlgesteuerter Reparaturvorgänge. Diesem Vorgang, der Apoptose der AECII, wird heute eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der IPF zugesprochen. Ein Argument für eine solche Annahme ist die bereits bei der Erstbeschreibung des UIP-Musters gemachte Beobachtung einer massiven Apoptose (damals als Nekrose bezeichnet) des Alveolarepithels, die sich bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen ließ. Verschiedene Studien bestätigten, dass die Apoptose von AECII dabei nicht nur in der Umgebung der Fibroblasten beobachtet werden kann [Uhal et al., 1998], sondern auch in Regionen mit beinahe normal wirkender alveolärer Struktur auftritt. Diese Verände-

rungen zeigen sich zudem schon in einem frühen Stadium der Erkrankung. In Fibrosemodellen konnte außerdem durch Blockade der Apoptosewege das Ausmaß der Lungenfibrose reduziert werden [Wang et al., 2000; Korfei et al., 2008]. Die Schädigung der AECII als Bildungsort von Surfactant spielt also eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose.

Bei Patienten mit Mutationen der Gene der Surfactantproteine konnte ein Zusammenhang zwischen fehlerhaft prozessierten Proteinen mit intra- und/oder extrazellulärer Akkumulation, hieraus resultierendem ER Stress und nachfolgender Apoptose und der Entstehung einer Lungenfibrose gezeigt werden [Thomas et al., 2002; Mulugeta et al., 2005]. Bei Patienten mit Leberzirrhose aufgrund eines α 1-Antitrypsin-Mangels ist ER Stress und die hieraus resultierende Entwicklung der Organfibrose bereits bekannt [Lomas et al., 1992]. ER Stress gleich welchen Ursprungs führt dabei (als eine Art Schutzmechanismus) zur *unfolded protein response* (UPR), mit Hochregulation von ER-ständigen Chaperonen, zu einer Steigerung von Abbauvorgängen (Proteindegradation) und zu einer generellen Herunterregulation der Translation. Anhaltender ER Stress führt zur Apoptose, wie sich mittels Caspase-3-Aktivierung als späten apoptotischen Marker zeigen lässt [Weichert et al., 2011]. Hierdurch können die unkontrollierten Abläufe einer Nekrose verhindert werden. Nach aktuellem Kenntnisstand ist dabei die Apoptose der Epithelzellen ein Schlüsselmechanismus in der Ursache der Entwicklung einer Fibrose und nicht Folge der fibrotischen Umbauten [Sisson et al., 2010].

1.7.2 Die Rolle von oxidativem Stress

Ein weiterer entscheidender Anteil am pathogenetischen Verständnis zur Entstehung einer IPF kommt oxidativem Stress zu. Für IPF-Patienten kann eine Erhöhung an ROS gezeigt werden, die in Alveolarmakrophagen und Fibroblasten gebildet werden. Sie bewirken eine Oxidation von Proteinen und Lipiden, wodurch zusätzlich ER Stress, mit der bereits beschriebenen Konsequenz der Apoptose, entstehen kann. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten vor allem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Reaktion auf vermehrt vorliegendes TGF (*transforming growth factor*)- β 1 bilden können. Wasserstoffperoxid kann, neben der Initiierung der Apoptose durch oxidierte Proteine und Lipide, selbst als parakrines Signal fungieren und dadurch einen Funktionsverlust der alveolären Epithelzellen bis hin zur Apoptose verursachen [Waghray et al., 2005]. Weiter besteht im alveolären Kompartiment ein Mangel an Antioxidantien, insbesondere fehlt Glutathion [Cantin et al., 1987; MacNee, Rahman, 1995]. Physiologische Abläufe

in der Prozessierung von Proteinen verbrauchen reduziertes Glutathion, der oxidative Stress dagegen führt zu einem anhaltenden Glutathionverbrauch, wodurch es wiederum zu Epithelschaden und Apoptose kommt. Auch oxidativer Stress selbst beeinflusst die Proteinfaltungen, so dass hier ein Circulus vitiosus entstehen kann [Behr et al., 2009]. Unterstützt wird diese Idee von der IFIGENIA-Studie, die zeigen konnte, dass hohe Dosen von Antioxidantien (N-Acetylcystein) ein Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen können [Demedts et al., 2005].

1.7.3 Die Rolle von Wachstumsfaktoren – Die gemeinsame Endstrecke fibrosierender Lungenerkrankungen

Unabhängig vom ursprünglichen Triggermechanismus findet sich bei interstitiellen Lungenerkrankungen eine Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter vor allem TGF- β [Eickelberg, 2001]. TGF- β fördert Fibroblastenchemotaxis, -proliferation und -differenzierung zu Myofibroblasten und steigert ihre Kollagensynthese [Border, Noble, 1994]. Bei IPF-Patienten findet sich eine vermehrte TGF- β -Expression in räumlicher Nähe zu akkumulierter extrazellulärer Matrix [Broekelmann et al., 1991] und eine experimentelle Blockade von TGF- β konnte die Kollagenablagerung in Bleomycin-induzierter Lungenfibrose bei Mäusen reduzieren [Giri et al., 1993].

Das histologische Korrelat einer Organfibrose ist letztlich die vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix in Form von Kollagen. Bei interstitiellen Lungenerkrankungen findet nicht nur eine überschießende Synthese dieser Proteine statt, es scheint auch ein lokales Ungleichgewicht zwischen Matrixmetalloproteinasen (MMP; können extrazelluläre Matrix aufspalten) und ihren Inhibitoren (so genannte *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* TIMP) vorzuliegen. Die Kollagenase MMP-1 ist dabei für den Abbau des interstitiellen Bindegewebes verantwortlich, während die TIMP diesen Abbau kontrolliert hemmen. Bei IPF-Patienten findet sich im Interstitium eine erhöhte Expression der TIMP, wo hingegen die Kollagenase MMP-1 kaum nachweisbar ist, so dass es zu einer vermehrten Bildung von Matrixproteinen kommt [Selman et al., 2000].

1.7.4 Die Rolle des Surfactants bei interstitiellen Lungenerkrankungen

Eine Reihe von Studien legen einen Zusammenhang zwischen Veränderungen in der Zusammensetzung oder Funktion des Surfactant und der Entwicklung einer ILD nahe. So konnten bei Patienten mit genetisch bedingten, also familiär gehäuft auftretenden, interstitiellen Lungenerkrankungen verschiedenste Veränderungen in der Zusammen-

setzung des pulmonalen Surfactant gefunden werden. Bei Patienten mit Mutationen im SP-C Gen ließ sich eine Akkumulation des mutierten und fehlgefalteten Proteins im ER zeigen, mit nachfolgendem ER Stress und epithelialer Apoptose [Wang et al., 2003; Mulugeta et al., 2005]. Diese Patienten wiesen eine pulmonale Fibrosierung mit NSIP- oder IPF-typischem UIP-Muster auf. Auch SP-C-*knock-out*-Mäuse zeigten, möglicherweise aufgrund des Verlustes des Proteins, eine fortschreitende Lungenerkrankung, das histologische Bild ähnelte dabei dem bei Idiopathischen interstitiellen Pneumonien [Glasser et al., 2003], andere Untersuchungen zeigten bei diesen *knock-out*-Mäusen ER Stress [Lawson et al., 2011]. Bei Patienten mit Mutationen im SP-A-Gen ließen sich ebenfalls Akkumulationen der fehlgefalteten Proteine mit resultierendem ER Stress und Apoptose nachweisen [Wang et al., 2009]. Patienten mit Mutationen im Gen für ABCA (ATP *binding cassette* Subtyp A) 3, einem Lipidtransporter in der Membran der Lamellarkörperchen, weisen das Bild einer ILD mit inkomplett prozessierten hydrophoben Surfactantproteinen und abnorm kleinen Lamellarkörperchen auf [Brasch et al., 2006]. Bei Patienten mit einem Hermansky-Pudlak-Syndrom, einer lysosomalen Speichererkrankung mit abnormer Funktion der Lamellarkörperchen, die eine Lungenfibrose mit histologischem UIP-Muster entwickeln können, konnten in der BAL reduzierte Spiegel an PL sowie der hydrophoben Surfactantproteine, im Lungengewebe allerdings eine intrazelluläre Akkumulation von Lipiden und Surfactantproteinen beobachtet werden [Guttentag et al., 2005; Mahavadi et al., 2010].

Frühere Untersuchungen konnten bereits aufdecken, dass bei Patienten mit IPF reduzierte Spiegel an PL in der BAL vorliegen [Honda et al., 1988], Zusammenhänge mit den Surfactantproteinen wurden allerdings erst 2001 mit Entdecken von Mutationen im Gen für SP-C gezeigt [Nogee et al., 2001; Thomas et al., 2002]. Alle diese Beobachtungen zeigen einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Surfactant-Zusammensetzung und der Pathogenese interstitieller Lungenerkrankungen. Daher kann auch bei Patienten mit sporadischen Formen einer IPF von Veränderungen in der Zusammensetzung des Surfactant ausgegangen werden.

1.8 Die Therapie der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose

Die Behandlung der IPF befindet sich in einer Umbruchphase. Der Einsatz von Kortikosteroiden, eventuell in Kombination mit Immunsuppressiva (hier vor allem Azathioprin und Cyclophosphamid) über sechs Monate, wie er von der ATS/ERS Konsensus-Konferenz noch 2000 empfohlen wurde [American Thoracic Society, 2000], führte nur in den seltensten Fällen zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes. Ganz

im Gegenteil: Unter anderem beobachtete man neben den nicht unerheblichen Nebenwirkungen eine erhöhte Anfälligkeit für pulmonale Infekte. Studien zu dieser Therapieform sind rar und konnten, den klinischen Beobachtungen entsprechend, keinen signifikanten Benefit zeigen [Johnson et al., 1989]. Entsprechend wird eine Behandlung mit Steroiden oder Immunsuppressiva gemäß den neuen Leitlinien auch nicht mehr empfohlen.

Seit wenigen Monaten gibt es für Patienten mit Idiopathischer Pulmonaler Fibrose allerdings eine neue Therapieoption:

Das erste in Europa zugelassene Medikament zur Therapie der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose ist Pirfenidon (Esbriet®). Es inhibiert die Kollagensynthese, setzt die Produktion verschiedener Zytokine herab und blockiert die Fibroblastenproliferation und -stimulation über Hemmung von TGF- β sowie TNF- α . Obgleich der genaue Wirkmechanismus unklar bleibt, stellt Pirfenidon sicherlich ein primär antifibrotisch wirksames Medikament dar. Zwei von insgesamt drei Studien zu diesem Medikament (eine japanische Studie sowie die multizentrische Studie CAPACITY2) zeigten signifikante Verbesserungen der Vitalkapazität sowie der progressionsfreien Überlebenszeit, in der dritten Studie (CAPACITY1) konnte zum Endpunkt keine Signifikanz gezeigt werden. Gepoolt zeigten beide CAPACITY Studien jedoch signifikante Verbesserungen der forcierten Vitalkapazität und im 6-Minuten-Gehtest. Pirfenidon scheint also ein neues und potentes antifibrotisches Medikament bei Patienten mit IPF zu sein, auch wenn die Krankheit an sich nicht aufgehalten werden kann [Taniguchi et al., 2010; Azuma, 2010; Noble et al., 2011; Gomer, Lupher, 2010]. Seit September 2011 ist Pirfenidon in Deutschland zur Behandlung von Erwachsenen mit leichter bis mittelschwerer IPF zugelassen.

Eine zusätzliche Behandlung mit N-Acetylcystein (NAC) zusätzlich zu Kortikosteroiden und Azathioprin zeigte einen positiven Effekt bei der IPF: In der multizentrischen, randomisierten, plazebokontrollierten, doppelblinden IFIGENIA-Studie wurde der Effekt einer oralen Verabreichung von 3 x 600 mg NAC täglich zusätzlich zur Basistherapie mit Prednison und Azathioprin untersucht. Es zeigte sich für die untersuchten Parameter Vitalkapazität und CO-Diffusionskapazität unter NAC-Therapie ein signifikant geringerer Abfall als in der Plazebogruppe unter alleiniger Prednison- und Azathioprin-Therapie [Demedts et al., 2005]. Allerdings musste vor kurzem eine randomisierte, kontrollierte Studie des US IPFnet wegen Übersterblichkeit im Steroid/Azathioprin/N-Acetylcystein-Arm abgebrochen werden (PANTHER-IPF-Studie). Weitere Analysen hierzu stehen noch aus.

Eine Studie an einer kleinen Patientenpopulation zum Nutzen von inhalativem NAC ohne weitere Therapie konnte keinen Benefit zeigen [Bando et al., 2010].

Studien mit Interferon- γ -1b (Interferon mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Funktionen) bei Patienten mit IPF konnten nicht überzeugen. Ziesche et al. zeigten zwar eine signifikante Steigerung der totalen Lungenkapazität sowie des Sauerstoffpartialdruckes bei Patienten mit ergänzender Behandlung mit Interferon- γ -1b, Raghu et al. beobachteten jedoch keine signifikanten Verbesserungen bei den primären Endpunkten progressionsfreies Überleben, Lungenfunktionsprüfung, Gasaustausch oder Lebensqualität [Ziesche et al., 1999; Raghu et al., 2004]. Auch die groß angelegte INSPIRE-Studie mit über 800 Patienten zeigte keinerlei Vorteile einer subkutanen Gabe von Interferon- γ -1b auf den Verlauf der Erkrankung im Vergleich zu Placebo [King et al., 2009].

Eine aktuelle Studie mit BIBF 1120, einem dreifachen Tyrosinkinase-Inhibitor gegen VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) sowie FGF (*fibroblast growth factor*) zeigt ersten Analysen zufolge einen reduzierten Abfall der Vitalkapazität, weniger Exazerbationen und eine höhere Lebensqualität im Vergleich zu Placebo [Richeldi et al., 2011].

Bei progredient verlaufender IPF stellt die Transplantation die letzte Therapieoption dar, ist jedoch nur selten realisierbar und im Vergleich zu Transplantationen anderer solider Organe mit einer deutlich schlechteren Langzeitprognose verbunden.

1.9 Fragestellung

Da aufgrund früherer Studien eine Veränderung der Phospholipidfraktion des alveolären Surfactant-Systems bei Patienten mit sporadischer IPF nachgewiesen werden konnte und da familiäre Formen der IPF einen Zusammenhang zwischen Mutationen einiger Surfactantproteine und dem Pathomechanismus der IPF offenbarten, war es nun Ziel dieser Studie, den intrazellulären Surfactant-Metabolismus und die Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C bei Patienten mit sporadischen IIP zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe molekularbiologischer und proteinchemischer Methoden versucht, mögliche Störungen der Surfactantsynthese und -prozessierung aufzudecken.

Folgende einzelne Fragestellungen standen im Mittelpunkt:

1. Lassen sich bei Patienten mit sporadischer Idiopathischer Pulmonaler Fibrose Veränderungen der intrazellulären Surfactant-Zusammensetzung nachweisen?
2. Sind hier auch die Surfactantproteine betroffen? Sind diese auf Transkriptebe- oder auch auf Proteinebene nachweisbar?
3. Lassen sich diese Veränderungen auch bei Patienten mit nicht-spezifischer interstitieller Pneumonie und Chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) nachweisen?
4. Wie sind die lysosomalen Proteasen Napsin A und Kathepsin H in der IPF exprimiert?
5. Wie sind Gehalt und Zusammensetzung der Phospholipide im Lungengewebe von Patienten mit IPF?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Labortechnische Geräte

- Homogenator Ultra-Turrax IKA, Staufen, Deutschland
- Photometer Uvikon 922 Kontron, Eching, Deutschland
- Gelscanner (AlphaEase[®]FC Imaging System) FluorChem[™] IS 8900 software, U. 3.2.3., San Leandro, CA, USA
- Gelträger für Agarosegel Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
- Elektrophoresekammer Von Keutz Labortechnik, D-Reiskirchen
- Zentrifugen: Tischzentrifuge bis 2 ml Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Varifuge 3.OR Heraeus Sepatech, Osterode
- GeneAmp PCR System 2400 AB Applied Biosystems, Foster City, USA
- UV-Transilluminator Biometra, Göttingen, Deutschland
- Reaktionsgefäße: Safe-Lock-Tubes Eppendorf, D-Hamburg
Polypropylen-Tubes Falcon, Meylan Cedex, Frankreich
- Semi-Dry-Blotting-Apparatur BioRad, München, Deutschland
- Thermocycler (Modell: GeneAmp PCR System 2400) AB Applied Biosystems, Foster City, USA
- TLC-Linomat IV-Applikator CAMAG, Muttenz, Schweiz
- Laufkammer CAMAG, Muttenz, Schweiz
- *Thin Layer* Chromatographie-Scanner CAMAG, Muttenz, Schweiz
- Mikrotiterplatten Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

- Mikrotiterplatten Reader (Spectrafluor Plus) Tecan, Crailsheim, Deutschland
- Thermoblock VLM Labtec, Bielefeld, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Acrylamid/Bis-Acrylamid Lsg. (37,5:1) [„Rotiphorese® Gel 30“] Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Agarose Carl Roth, D-Karlsruhe
- Amersham Hyperfilm™ ECL GE Healthcare, München
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) Carl Roth, D-Karlsruhe
- Ammoniumheptamolybdat Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ascorbinsäure Carl Roth, D-Karlsruhe
- Bromphenolblau Merck, D-Darmstadt
- BSA (Rinder-Serum-Albumin) Carl Roth, D-Karlsruhe
- Butylhydroxytoluol Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Chloroform Merck, D-Darmstadt
- Coomassie Brilliant Blue R-250 Serva, Heidelberg, Deutschland
- Deoxycholsäure, Natriumsalz Fluka (Sigma Aldrich), München, Deutschland
- dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) Finnzymes, Espoo, Finnland
- Dünnschichtplatten (HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60, 20 x 10 cm, Best.Nr. 5641) Merck, D-Darmstadt
- ECL Plus Western Blotting Detection System GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
- EDTA Merck, D-Darmstadt
- Eisessig (Essigsäure) Merck, D-Darmstadt
- Ethanol Carl Roth, D-Karlsruhe
- Ethidiumbromid Serva, D-Heidelberg
- E-64-Protease-Inhibitor AnaSpec, San Jose, CA, USA
- Filterpapiere (GB005-Whatman-Papier) Whatman (GE Healthcare),

• Glycerin	Freiburg, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland
• Glycin	Carl Roth, D-Karlsruhe
• HotStarTaq® -DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
• Schwefelsäure (konz.) [H ₂ SO ₄]	Merck, D-Darmstadt
• Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
• Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, D-Karlsruhe
• β-Mercaptoethanol	Fluka (Sigma-Aldrich), D-München
• Methanol	Carl Roth, D-Karlsruhe
• MGAS-1 (QxI520-KKTSVLMAAPQ-Lys- HiLyte Fluor 488)- Fluoreszenz-markiertes Peptid	AnaSpec, San Jose, CA, USA
• Milchpulver	Fluka (Sigma-Aldrich), D-München
• Molmarker für DNA, „SmartLadder“	Eurogentec, Köln, Deutschland
• MoO ₃ (Molybdäntrioxid)	Merck, D-Darmstadt
• Molybdän (Mo) -Pulver	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
• Natriumacetat	Merck, D-Darmstadt
• Na ₂ EDTA	Carl Roth, D-Karlsruhe
• NaCl	Fluka (Sigma-Aldrich), D-München
• Oligo-dT-Primer	AB Applied Biosystems, Foster City, USA
• Perchlorsäure	Merck, D-Darmstadt
• PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva, Heidelberg, Deutsch- land
• 2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
• Proteinmarker-Leiter, prestained	Invitrogen (Life Technolo- gies), D-Darmstadt

- | | |
|--|---|
| • PVDF-Membran (Amersham Hybond™-P) | GE Healthcare, Freiburg, Deutschland |
| • Random Hexamers | AB Applied Biosystems, Foster City, USA |
| • RNase-Inhibitor (20 Units/μl) | AB Applied Biosystems, Foster City, USA |
| • RNase freies H ₂ O | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| • RNAzol™B | WAK-Chemie, Steinbach |
| • Saccharose | Carl Roth, D-Karlsruhe |
| • SDS (Natriumdodecylsulfat) | Carl Roth, D-Karlsruhe |
| • N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Fluka (Sigma-Aldrich), D-München |
| • Triton X-100 | Sigma Aldrich, D- München |
| • TRIS [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] | Carl Roth, D-Karlsruhe |
| • Tween 20 | Sigma-Aldrich, D-München |

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper:

- | | |
|---|-------------------------------|
| • Anti-human β-Aktin (rabbit polyclonal) | Abcam (ab8227) |
| • Anti-human Kathepsin H (mouse monoclonal) | Abcam (ab7432) |
| • Anti-rabbit Na ⁺ , K ⁺ -ATPase (mouse monoclonal) | Millipore (upstate), # 05-382 |
| • Anti-human Napsin A (goat polyclonal) | Abcam (ab9868) |
| • Anti-sheep matures SP-B (rabbit polyclonal) | Millipore (Chemicon), ab 3780 |
| • Anti-human matures SP-C (rabbit polyclonal) | Nycomed, ehemals Altana |
| • Anti-human pro-SP-B (rabbit polyclonal) | Millipore (Chemicon), ab 3430 |
| • Anti-human pro-SP-C (rabbit polyclonal) | Millipore (Chemicon), ab 3786 |
| • Anti-human SP-A (mouse monoclonal) | Dako Japan, (Clone PE-10) |
| • Anti-human TTF-1 (rabbit polyclonal) | Millipore (upstate), # 07-601 |

Sekundärantikörper:

- Polyclonal Swine Anti-Rabbit-IgG, HRP-Konjugat Dako, Glostrup, Denmark
- Polyclonal Rabbit Anti-Goat-IgG, HRP-Konjugat Dako, Glostrup, Denmark
- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse-IgG, HRP-Konjugat Dako, Glostrup, Denmark

2.1.4 Oligonukleotide (Primer für RT-PCR)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried, Deutschland synthetisiert.

<i>hsABCA3</i> -Forward	5'- CTT CAT CAT GCC CTC CTA TTG G - 3'
<i>hsABCA3</i> -Reverse	5'- TGA TGT ATG CCC GTC CAC TG - 3'
<i>hsβ-Aktin</i> -Forward	5'- ACC CTG AAG TAC CCC ATC G - 3'
<i>hsβ-Aktin</i> -Reverse	5'- CAG CCT GGA TAG CAA CGT AC - 3'
<i>hsCC10</i> -Forward	5'- TCC GCT TCT GCA GAG ATC TG - 3'
<i>hsCC10</i> -Reverse	5'- GTG TCC ACC AGC TTC TTC AG - 3'
<i>hsCCTα</i> -Forward	5'- TAC GTG GAT GAG GTG GTG AG - 3'
<i>hsCCTα</i> -Reverse	5'- TCA ACC CTC TCC TGC AAG TG - 3'
<i>hsCD36</i> -Forward	5'- GTG CAA AAT CCA CAG GAA GTG - 3'
<i>hsCD36</i> -Reverse	5'- ACA GCC AGA TTG AGA ACT GTG - 3'
<i>hsKathepsin H</i> -Forward	5'- CCA TCG CAA CCG GAA AGA TG - 3'
<i>hsKathepsin H</i> -Reverse	5'- ACA TCA TGA AGT CCT GAG TCA C - 3'
<i>hsNa⁺, K⁺-ATPase-β1</i> -Forward	5'- AGC CCA GAG GGA TGA CAT G - 3'
<i>hsNa⁺, K⁺-ATPase-β1</i> -Reverse	5'- TCC TTA TCT TCA TCT CGC TTG C - 3'
<i>hsNapsin A</i> -Forward	5'- TCA CCT TCG TGC CAG TCA C - 3'
<i>hsNapsin A</i> -Reverse	5'- TCG AAG ACG GCC ACA TAC G - 3'
<i>hsSP-A</i> -Forward	5'- ATC TAG ATG AGG AGC TCC AAG C - 3'
<i>hsSP-A</i> -Reverse	5'- CCT CAG TCA GGC CTA CAT AGG - 3'
<i>hsSP-B</i> -Forward	5'- AAG TGC TTG ACG ACT ACT TCC - 3'
<i>hsSP-B</i> -Reverse	5'- GCT TGG ATC CGC TTG ATC AG - 3'
<i>hsSP-C</i> -Forward	5'- CTC ATC GTC GTG GTG ATT GTG - 3'
<i>hsSP-C</i> -Reverse	5'- CTG CAG AGA GCA TTC CAT CTG - 3'
<i>hsSP-D</i> -Forward	5'- CCA CAG AAC AAT GCC CAG TG - 3'
<i>hsSP-D</i> -Reverse	5'- TTG CCC TGA GGT CCT ATG TTC - 3'

2.1.5 Phospholipide

Alle Phospholipide wurden von der Firma Sigma Aldrich, München, Deutschland bezogen.

- Phosphatidylcholin (PC) Di-Arachidoyl (Di-20:0)
- Phosphatidylcholin (PC) Di-Palmitoyl (Di-16:0)
- Phosphatidylglycerol (PG)
- Phosphatidylserin (PS)
- Phosphatidylinositol (PI)
- Phosphatidylethanolamin (PE)
- Lysophosphatidylcholin (LPC)
- Sphingomyelin (SPH)
- Cardiolipin (CL)

2.1.6 Verwendete Kits

- Omniscript®-RT-Kit (Qiagen, Hilden)
 - 10 x Puffer RT
 - dNTP Mix (je 5 mM der Nukleotide)
 - Reverse Transkriptase
- Pierce® BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA)
 - BCA-Arbeitslösung: Mischung aus Reagenz A und Reagenz B des Kits im Verhältnis 50:1
- ECL™ (Enhanced Chemiluminescence) Plus Western Blotting System-Kits (Amersham, GE Healthcare)
 - Färbelösung „ECL™ Western Blotting Reagents“: Lösung A und B, Mischung aus Reagenz A und Reagenz B des Kits im Verhältnis 40:1

2.1.7 Lungengewebe

Für die hier vorgenommenen Analysen standen uns explantierte Lungen von IPF (IPF_{LTX})-, NSIP (fibrosierender Subtyp; NSIP_{LTX})- und COPD-Patienten sowie nicht-utilisierte Donor-Lappen oder -Lungen durch die Kooperation mit dem Klinikum der Stadt Wien (Thoraxchirurgie, Univ. Professor Dr. Walter Klepetko) zur Verfügung. Die dort im Rahmen einer Transplantation den Patienten explantierten Lungen wurden nach Spülung und Konservierung wie bei Spenderorganen schnellstmöglich auf Eis

nach Gießen transportiert. Die Diagnose einer IPF (UIP-typisches histologisches Muster), einer fibrosierenden NSIP oder einer COPD wurde nochmals in Gießen histopathologisch bestätigt. Sofort nach Erhalt wurde das Gewebe nach einem definierten Schema in einzelne Lungenstücke geschnitten: Für die in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Analysen wurde ausschließlich peripheres Lungengewebe aus dem Unterlappen (Region C1, Abb. 10) verwendet.

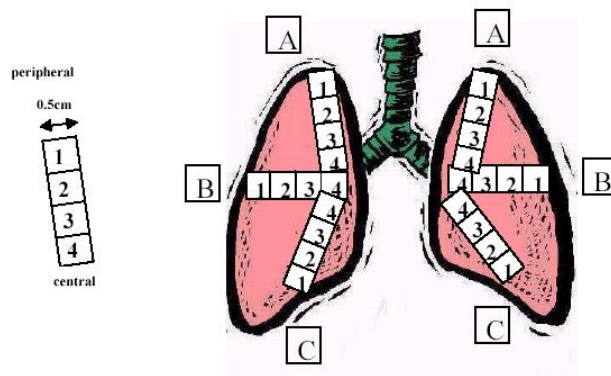


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lungenaufbereitung

Zudem wurden auch nicht mehr genutzte Lungengewebeproben von Patienten mit IPF nach Abschluss der Erstdiagnostik mittels Video-assistierter Lungenbiopsie (IPF_{VATS}) für diese Fragestellungen untersucht.

Als gesunde Kontrollen dienten nicht-utilisierte Spenderlappen oder (selten) ganze Lungen, die histologisch keinen Anhalt für eine floride Lungenerkrankung boten und die aufgrund von Größeninkompatibilitäten zwischen Spender und Empfänger oder akuter Infektion der möglichen Empfänger nicht eingesetzt wurden.

Alle hier durchgeführten biochemischen Untersuchungen am Menschen wurden durch entsprechende Voten der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen abgedeckt (Nr. 31/93 „Weitergabe von OP-Präparaten“, Nr. 84/93 „Biochemische, pharmakologische und morphologische Studien an bronchoalveolären Lavagen“, Nr. 29/01 „Restmengen von Blut- und Gewebeproben zu Forschungszwecken“, Nr. 111/08 „Europäisches IPF-Register (eurIPFreg)“).

Die demographischen und klinischen Daten der Patientenkollektive für die untersuchten Lungenhomogenate sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Demografische und klinische Daten der Patientenkollektive (Lungengewebe/UGMLC-Biobank)

	Sporadische IPF _{LTX} (n=20)	Sporadische IPF _{VATS} (n=4)	NSIP _{LTX} (n=7)	COPD _{LTX} (n=9)	Donorlungen (n=12)
Durchschnittsalter (Jahre \pm SEM)	55,2 \pm 2,9	62,3 \pm 1,9	51,3 \pm 9,2	55,2 \pm 1,4	45,0 \pm 5,3
Geschlecht (m/w)	14/6	3/1	3/4	6/3	6/6
FVC (Mittelwert \pm SEM) [% vom Soll]	49,5 \pm 3,0	61,9 \pm 8,6	n. v.	38,4 \pm 3,0	n. v.
FEV1 (Mittelwert \pm SEM) [% vom Soll]	54,6 \pm 3,3	68,0 \pm 7,7	n. v.	17,0 \pm 1,2	n. v.
Raucherstatus aktuell/ehe- mals/nie	0/11/9	0/3/1	n. v.	0/9/0	n. v.
PY (Mittelwert \pm SEM)	33,0 \pm 9,2	11,3 \pm 6,5	n. v.	51,8 \pm 7,7	n. v.
Histologie	UIP-Muster	UIP-Muster	<i>fibrotic</i> NSIP-Muster	COPD	Normal; minimale Inflammation

IPF = Idiopathische Pulmonale Fibrose; NSIP = nicht-spezifische interstitielle Pneumonie, fibrosierender Subtyp; COPD = Chronisch obstruktive Lungenerkrankung; LTX = Lungentransplantat; VATS = Video-assistierte Lungenbiopsie; FVC = forcierte Vitalkapazität; FEV1 = Einsekundenausatemkapazität; PY = *pack years*; UIP = *usual interstitial pneumonia*; SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n. v. = nicht verfügbar

2.1.8 Bronchoalveoläre Lavage

Zur Gewinnung bronchoalveolärer Lavage wurde ein flexibles Fiberbronchoskop (Firma Olympus, Hamburg) nach Lokalanästhesie (Wirkstoff Oxybuprocainhydrochlorid) des Mund-Rachenraumes durch den Mund oder den endotracheal gelegenen Beatmungstubus eingeführt und eines der beiden Lingulasegmente oder der Mittellappen dargestellt. In Okklusionsstellung (*wedge position*) wurde anschließend eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit zehn 20 ml-Portionen steriler physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) durchgeführt. Nach jeder Instillation wurde die Flüssigkeit durch schnelle Aspiration wieder entfernt, die *Recovery* (Materialgewinnung der Ausgangsmenge in %) ermittelt und bei +4 °C gepoolt. Die so erhaltene Lavageflüssigkeit wurde zur Abtrennung von Mukus durch sterile Gaze gefiltert und zur Entfernung zellulärer Bestandteile bei 300 \times g und +4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sorgfältigem Rühren aliquotiert, mittels Flüssigstickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Teile der Lavageflüssigkeit wurden mit

0,01 % Butylhydroxytoluol als Antioxidans versetzt. Bei IPF-Patienten wurde die BAL im Rahmen klinischer Routinemaßnahmen durchgeführt und die Verwendung nicht mehr benötigter BAL-Reste für diesen wissenschaftlichen Zweck durch die Ethikkommission zugelassen (Voten siehe oben). Für diese Arbeit standen zehn Lavagen von IPF-Patienten zur Verfügung. Als Kontrollgruppe dienten acht gesunde Probanden, bei denen die Bronchoskopie, Gewinnung und Verarbeitung der BAL in gleicher Weise, aber ausschließlich für wissenschaftliche Zwecke, durchgeführt wurde. Dies wurde ebenfalls von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Nr. 51/01 „Inhalative Heparinapplikation bei Lungengesunden“) und nach Erlangung des Einverständnisses der Probanden durchgeführt.

Tabelle 2 zeigt die klinischen Daten der lavagierten Patienten und Freiwilligen.

Tabelle 2: Demografische und klinische Daten der Patientenkollektive (BALF/UGMLC-Bio-bank)

	IPF _{BALF} (n=10)	FS _{BALF} (n=8)
Durchschnittsalter (Jahre \pm SEM)	64,7 \pm 2,5	24,8 \pm 1,3
Geschlecht (m/w)	6/4	6/2
FVC (Mittelwert \pm SEM) [% vom Soll]	71,8 \pm 7,7	103,3 \pm 2,6
FEV1 (Mittelwert \pm SEM) [% vom Soll]	75,1 \pm 6,0	106,7 \pm 2,7
Raucherstatus aktuell/ehe- mals/nie	1/3/6	0/0/8
PY (Mittelwert \pm SEM)	25,0 \pm 17,5	0
Histologie	UIP-Muster	n. v.

IPF = Idiopathische Pulmonale Fibrose; FS = freiwilliger Spender; BALF = Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit; FVC = forcierte Vitalkapazität; FEV1 = Einsekundenausatemkapazität; PY = *pack years*; UIP = *usual interstitial pneumonia*; SEM = Standardfehler des Mittelwertes; n. v. = nicht verfügbar

2.2 Methoden

2.2.1 Genexpressionsanalyse

2.2.1.1 Isolierung von RNA

Um eine Kontamination mit RNAsen weitestgehend auszuschließen, erfolgten alle Arbeiten mit RNase-freien Pipettenspitzen und autoklavierten Cups.

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus pulmonalem Gewebe wurde 1 cm³ (1 - 2 g) schockgefrorenes Lungengewebe mit RNazol-Lösung (2 ml pro 100 mg Gewebe) in einem 50 ml Falcon-Cup versetzt und sofort mit dem Homogenator (Ultra-Turrax) auf höchster Stufe zerkleinert.

Auf dieses RNazol-Homogenat wurde dann 10 % des Gesamtvolumens Chloroform gegeben und erneut gevortext. Die Probe erhielt eine milchig weiße Farbe. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Gemisch 20 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Dadurch erfolgte eine Phasentrennung: Die untere Phase wurde von der organischen, blauen Phenol-Chloroform-Phase gebildet, diese enthielt DNA und Proteine. Die obere wässrige Phase enthielt die zu isolierende Gesamt-RNA und wurde nun in ein neues Cup überführt. Zur Fällung der RNA fügte man das gleiche Volumen Isopropanol hinzu und inkubierte 1 h bei -20 °C. Eine erneute Zentrifugation erfolgte bei 14 000 rpm und 4 °C für 15 Minuten. Der Überstand wurde mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das so gewonnene Pellet wurde 2 x mit 500 µl - 1 ml 80%igem Ethanol gewaschen und während der Waschprozedur in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Erneut wurde bei 4 °C mit 14 000 rpm, diesmal 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur 10 min getrocknet. Anschließend wurde es in einem geeigneten Volumen RNase freien Wasser aufgenommen, resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.1.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Die Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurden 1 µl RNA mit 99 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ergab den Reinheitsquotienten der RNA, ein Maß für die Verunreinigung mit Proteinen. Dieser Wert sollte zwischen 1,6 und 2 liegen.

Da bei einer optischen Dichte von 1 eine RNA-Konzentration von 40 ng/μl vorlag, ließ sich die RNA-Konzentration der einzelnen Cups über folgende Gleichung bestimmen:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/μl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Da hier eine einhundertfache Verdünnung angewandt wurde, lässt sich die Gleichung zu

$$\text{RNA-Konzentration [μg/μl]} = E_{260} \times 4$$

vereinfachen.

2.2.1.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Gewinnung von cDNA wurde die mRNA mithilfe der Reversen Transkription umgeschrieben. In jedem Cup wurden je 2 μg Gesamt-RNA vorgelegt und mit RNase freiem Wasser auf 4 μl aufgefüllt.

Für die reverse Transkription (2 μg-Ansatz in einem Volumen von 20 μl) wurde folgendes Protokoll angewandt:

<i>RNA (2 μg) in H₂O</i>	<i>4 μl</i>
<i>10 × Puffer RT</i>	<i>2 μl</i>
<i>dNTP Mix</i>	<i>2 μl</i>
<i>Random Hexamers (50 μM, finale Konzentration 10 μM, von Applied Biosystems)</i>	<i>4 μl</i>
<i>RNase-Inhibitor (20 Units/μl, Applied Biosystems)</i>	<i>0,5 μl</i>
<i>Omniscript Reverse Transkriptase</i>	<i>1 μl</i>
<i>RNase freies H₂O auf:</i>	<i>6,5 μl</i>

In manchen Fällen wurden anstelle der Random Hexamers sogenannte Oligo-dT-Primer (50 μM, Applied Biosystems) verwendet. Für einen 20 μl-RT-Ansatz wurde 1 μl Oligo-dT-Primer (finale Konzentration 2,5 μM) eingesetzt.

Nach dem Zusammenpipettieren wurde der RT-Ansatz gevortext, kurz abzentrifugiert (30 sek, 10 000 rpm) und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der Ansatz für 65 min bei 37,3 °C in einem Thermocycler (Modell:

GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) inkubiert. Die nun gewonnene cDNA (in der Konz. 100 ng/μl) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.4 Amplifikation von Nukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion (Semi-quantitative PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die enzymatische Vermehrung bestimmter Nukleotidsequenzen in vitro [Saiki et al., 1988]. Bei hoher Spezifität ist eine schnelle und einfache Durchführung möglich. Außerdem können auch sehr geringe Mengen DNA einer Analyse zugänglich gemacht werden.

Der PCR-Ansatz (25 μl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

<i>zu amplifizierende cDNA</i>	<i>2 μl (von cDNA-Konz. 100 ng/μl)</i>
<i>10 × PCR-Puffer</i>	<i>2,5 μl</i>
<i>dNTP-Mix (10mM)</i>	<i>0,5 μl (finale Konz. 0,25 mM)</i>
<i>Sense-Primer (10 pmol/μl)</i>	<i>2 μl (finale Konz. 20 pmol)</i>
<i>Antisense-Primer (10 pmol/μl)</i>	<i>2 μl (finale Konz. 20 pmol)</i>
<i>HotStarTaq®-DNA Polymerase (Qiagen)</i>	<i>0,25 μl</i>
<i>H₂O dest.</i>	<i>15,75 μl</i>

Die genspezifischen Primer wurden mit Hilfe der GeneFisher-Software (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>) abgeleitet und von der Firma metabion international AG (Martinsried) synthetisiert.

Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

<i>Hot-Start</i>	94 °C	20 Minuten
<i>Denaturierung</i>	94 °C	30 Sekunden
<i>Primer-Annealing</i>	T_a	30 Sekunden
<i>Elongation</i>	72 °C	1 Minute
<i>Final Extension</i>	72 °C	10 Minuten

Die PCR-Reaktion bestand aus 30 Zyklen, beginnend mit Denaturierung, *Primer-Annealing* (Anlagerung; bei Temperatur T_a) und schließlich Elongation. Nach Abschluss der *Final Extension* endete die Reaktion durch Abkühlen auf 4 °C.

Die so amplifizierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Die Temperatur zur Primer-Anlagerung T_a berechnete sich aus der Schmelztemperatur T_m minus 5 °C.

$$T_a = T_m - 5\text{ °C}$$

$$T_m = 4\text{ °C} \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2\text{ °C} \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

2.2.1.5 Analyse des PCR-Produktes durch DNA-Agarosegelelektrophorese

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit Hilfe eines 2%igen (w/v) Agarosegels analysiert. Dazu wurden 3 g Agarose abgewogen, mit 150 ml 1 × TAE-Puffer aufgegossen und in der Mikrowelle aufgeschmolzen. Nach kurzer Abkühlung wurde dem Gel 20 µl 0,2 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und das Gel in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Dieser wurde nach Erstarren des Gels entfernt und das Agarosegel in der Elektrophoresekammer mit 1 × TAE überschichtet.

Zu den Proben wurden 6 µl Probenpuffer (RB) gegeben, gevortext, kurz abzentrifugiert und 10 µl auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Größenabschätzung diente ein Molmarker („SmartLadder“, Eurogentec, Köln, Deutschland), von dem 5 µl aufgetragen wurden.

<i>50 × Tris-Acetat-EDTA (TAE)</i>	<i>242 g Tris</i> <i>57,1 ml Eisessig (Essigsäure 99 %)</i> <i>100 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8</i> <i>mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen</i>
<i>1 × Tris-Acetat-EDTA (TAE)</i>	<i>20 mL 50 × TAE</i> <i>mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen</i>
<i>5 × Probenpuffer (5 × Running Buffer RB)</i>	<i>5 ml Glycerin</i> <i>200 µl 50 × TAE</i> <i>400 µl Bromphenolblau</i> <i>4,4 ml Aqua dest.</i>

Die Lagerung des 5 × RB erfolgte bei -20 °C in 1 ml-Aliquots, das jeweils verwendete Cup wurde bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach dem Auftragen der Proben in die Geltaschen erfolgte die Elektrophorese etwa eine Stunde bei einer angelegten Spannung von 10 V pro cm Gellänge. Anschließend konnten die DNA-Banden mittels UV-Transilluminator bei 302 nm analysiert werden.

2.2.2 Analyse von Proteinen

2.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Lungengewebe (Lungenhomogenate)

Um ein Proteinextrakt aus humanem Lungengewebe herzustellen, wurde 1 cm³ (1 – 2 g) gefrorenes Lungengewebe mit einem Skalpell rasch in kleine Stücke zerschnitten und im Anschluss in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Danach wurde das Pulver mit 3 - 5 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Frischgewicht versetzt und für 1 - 2 h auf einem Eisbad inkubiert.

<i>Aufschlusspuffer</i>	<i>50 mM Tris/HCl, pH 7.5</i>
	<i>150 mM NaCl</i>
	<i>1% (w/v) Triton X-100</i>
	<i>0,5% (w/v) Deoxycholsäure-Natriumsalz</i>
	<i>5 mM EDTA</i>
	<i>1-2 mM PMSF (frisch dazusetzen von 100 mmol-Stammlösung)</i>

Der so erhaltene "Lungenrohextrakt" wurde dann durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C von den Zelltrümmern befreit. Das erhaltene klarzentrifugierte Lungenhomogenat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Quantitative Proteinbestimmung mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit

Das Gesamtprotein wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) bestimmt, basierend auf der Reaktion von Cu^+ mit Bicinchoninsäure. Die hierfür durchgeführte photometrische Proteinbestimmung bei E_{562} erfolgte im 96-well-Mikrotiterplatten-Maßstab. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die zu messenden Lungenhomogenate wurden 1:10 mit H_2O dest. verdünnt und hiervon je 10 μl in die Wells pipettiert. Es wurde eine Eichgerade durch Dreifachbestimmung von BSA (Rinder-Serum-Albumin)-Proben für den Mengenbereich von 1 bis 10 μg Protein (jeweils in 10 μl -Volumen) erstellt. Nach Zugabe von 200 μl BCA-Arbeitslösung (vom Kit) zu den Proteinlösungen (10 μl -Volumen) erfolgte eine 40-minütige Inkubation bei 37 °C (60 min bei Raumtemperatur) zur Farbentwicklung (violett), bevor die Extinktion bei 562 nm gegen eine gleich behandelte Referenzprobe ohne Protein (Null-Wert = H_2O oder entsprechender Lysis-Puffer) im Mikrotiterplatten-Reader gemessen wurde.

Die Auftragung von E_{562} gegen Ig (μg) BSA sollte eine Gerade ergeben. Mit Hilfe der ermittelten Geradengleichung konnten anhand der jeweiligen Extinktion die Proteinmengen bestimmt werden; dies erfolgte direkt durch die verwendete Software.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Proteindenaturierung und Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Lungenhomogenate direkt mit einem 4 × SDS-Probenpuffer (PP) versetzt (z. B. 90 µl Homogenat mit 30 µl 4 × SDS-PP).

4 × SDS-Probenpuffer (100ml)	25% (v/v) 0,625 M Tris/HCl, pH 6.8
(nicht-reduzierend)	40 % (v/v) Glycerin
	5 % (w/v) SDS
	0,002 % (w/v) Bromphenolblau (Spatelspitze)
4× SDS-Probenpuffer	90% (v/v) 4 × SDS-PB (siehe oben)
(reduzierend)	10% (v/v) β-Mercaptoethanol

Reduzierender 4 × SDS-Probenpuffer wurde grundsätzlich frisch hergestellt.

Die mit 4 × SDS-Probenpuffer versetzten Lungenprotein-Extrakte wurden zur Denaturierung für 10 min bei 95 °C erhitzt. Nach der 1970 von Lämmli [Laemmli 1970] entwickelten Methode erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine nach ihrem (Untereinheiten-) Molekulargewicht in einer vertikalen Gelapparatur.

Analytische SDS-PAGE nach Lämmli

Zur Analyse von Proteinen in einem Größenbereich von 5 bis 300 kDa wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Lämmli (1970) angewandt.

Zur Herstellung der Gelmatrix wurde eine wässrige Lösung aus 30 % (w/v) Acrylamid mit 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid verwendet (Rotiphorese Gel 30, Fa.Roth, Karlsruhe).

Das fertige Gel bestand aus einem Sammelgel [4 % (w/v) Acrylamid, pH 6.8], in dem die Fokussierung der Proteine erfolgte, und einem Trenngel [je nach Fragestellung 8 - 15 % (w/v) Acrylamid, pH 8.8] zur Auftrennung der Proteine. Die Tabelle 3 zeigt das Pipettierschema für die Herstellung von 8 - 15 % SDS-Pages.

Tabelle 3: Pepettierschema des Sammel- und Trenngels für die SDS-Pages

SDS-Page	Trenngel, jeweils 10 ml					Sammelgel, 10 ml
	8 %	9 %	10 %	12 %	15 %	4 %
30 % Acrylamid 0,8 % N,N-Bisacrylamid	2,66 ml	3,0 ml	3,33 ml	4,0 ml	5,0 ml	1,33 ml
dest. H ₂ O	3,87 ml	3,53 ml	3,20 ml	2,53 ml	1,53 ml	6,57 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
1,125 M Tris/HCl pH 8.8 30 % (w/v) Saccharose (Trenngelpuffer)	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml	3,33 ml	-
0,625 M Tris/HCl pH 6.8 (Sammelgelpuffer)	-	-	-	-	-	2,0 ml
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	100 µl
TEMED (Fluka)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Die anderen benötigten Lösungen waren 10 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Die folgende Tabelle 4 zeigt die finalen Konzentrationen im Sammel- bzw. Trenngel.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels bei der SDS-Page

<i>Gelzusammensetzung</i>	<i>Sammelgel</i>	<i>Trenngel</i>
<i>Acrylamid in % (w/v)</i>	<i>4</i>	<i>8 - 15</i>
<i>Puffer</i>	<i>125 mM Tris/HCl</i> <i>pH 6.8</i>	<i>375 mM Tris/HCl</i> <i>ph 8.8</i> <i>10 % (w/v) Saccharose</i>
<i>SDS in % (w/v)</i>	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>
<i>Polymerisationsstarter</i>		
<i>TEMED in % (v/v)</i>	<i>0,001</i>	<i>0,001</i>
<i>APS in % (w/v)</i>	<i>0,1</i>	<i>0,05</i>

Nach der vollständigen Polymerisation der Gelmatrix wurden der Kathoden- und der Anodenraum der Gelapparatur mit Elektrodenpuffer aufgefüllt.

Elektrodenpuffer (EP)

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

10 x Elektrodenpuffer EP

60,6 g Tris

(für 2 l)

288,2 g Glycin

20 g SDS

Ad 2 l mit H₂O

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke erfolgte die Auftrennung der Proteine im Gel. Bei kleinen Gelen (Laufstrecke < 10 cm) waren 10 - 20 mA, bei größeren Gelen (Laufstrecke > 10 cm) 20 - 35 mA erforderlich. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Proteine entweder direkt mit Coomassie Blue angefärbt (Abschnitt 2.2.2.4) oder zur Durchführung einer Immunanfärbung auf PVDF transferiert (Abschnitt 2.2.2.5).

Als Protein-Größenstandard diente eine Proteinmarker-Leiter der Fa. Invitrogen.

Größe der Fragmente in kDa:

10, 15, 20, 25, 40, 50, 60, 85, 120, 190

2.2.2.4 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Stain)

Zur Analyse der nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine eignet sich die Anfärbemethode mit Coomassie Brilliant Blue, bei der die Proteine direkt im Gel angefärbt werden. Hierzu wurde das Gel kurz mit Wasser gewaschen, zur Anfärbung 30 min im Färber geschwenkt und der Hintergrund anschließend mit Entfärber freigewaschen.

<i>Färber</i>	50 % (v/v) Methanol
	5 % (v/v) Eisessig
	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
<i>Entfärber</i>	28 % (v/v) 2-Propanol
	5 % (v/v) Eisessig

Nach dem Entfärben wurde das Gel mit H₂O dest. gewaschen und zur Dokumentation eingescannt.

2.2.2.5 Immunologische Verfahren

Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Nach der von Kyhse-Andersen [Kyhse-Andersen, 1984] entwickelten Methode des Western Blots wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch ein Halbtrockenblot-Verfahren auf PVDF-Membranen transferiert.

Die für den Blotvorgang benötigten Filterpapiere (GB005-Whatman-Papier) und die PVDF-Membran mussten zuerst auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten werden. Anschließend wurde die PVDF-Membran durch einminütiges Inkubieren in 100 % Methanol "aktiviert" und in einen Transferpuffer gelegt. Auf die Graphitanode der Blotting-Apparatur wurden zwei Papiere GB005 gelegt, welche zuvor in Transferpuffer getränkt wurden. Die ebenfalls in Transferpuffer getränkte PVDF-Membran und das

SDS-Gel wurden luftblasenfrei darüber gelegt und mit zwei weiteren, in Puffer getränkten Papieren GB005 bedeckt.

Die Blotapparatur wurde abschließend mit der Graphitkathode verschlossen.

<i>Blotpuffer/Transferpuffer</i>	<i>20 mM TRIS (2,42 g)</i>
	<i>150 mM Glycin (11,26 g)</i>
	<i>20 % (v/v) Methanol (200 ml)</i>
	<i>Aqua dest. auf 1 l</i>

Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm² für ein bis zwei Stunden.

Immunanfärbung von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte die Inkubation mit monoklonalen bzw. polyklonalen Erstantikörpern. Anschließend erfolgten, je nach verwendetem Erstantikörper, die Immunanfärbungen mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen-IgG, Ziege-IgG oder Maus-IgG.

Um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, inkubierte man zunächst die geblottete PVDF-Membran für mindestens eine Stunde bei RT in Blockpuffer.

<i>TBS</i>	<i>50 mM Tris/HCl, pH 7.5</i>
	<i>50 mM NaCl</i>
<i>TBS-Tween 20 (TBS-T)</i>	<i>wie TBS mit 0,5 % (w/v) Tween 20</i>
<i>Blockpuffer (= Milchpulverlösung)</i>	<i>5 % (w/v) Milchpulverlösung in TBS-T</i>

Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen. Der jeweils verwendete Erstantikörper (in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:10 000 je nach Menge des zu analysierenden Proteinextrakts bzw. je nach Beschaffenheit des verwendeten Antikörpers) wurde für die Reaktion in 10 bis 20 ml (je nach Größe der Membran) frisch angesetzte Blocklösung gegeben und der Blot darin über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal mit TBS-T für je 15 Minuten gewaschen. Hiernach erfolgte die Inkubation des Western Blots mit einem HRP-gekoppelten Zweit-

antikörper in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration in 20 - 50 ml Blockpuffer (Verdünnungen 1:1000- 1:2000) für zwei Stunden bei RT unter Schwenken.

Nach vier weiteren Waschschritten (je 15 min) mit TBS-T erfolgte die Detektion mit Hilfe des ECL™ (Enhanced Chemiluminescence) Plus Western Blotting System-Kits. Dabei wird das Substrat des Kits durch die Meerrettichperoxidase zu Acridin-Ester-Intermediaten umgesetzt, welche anschließend mit Peroxiden reagieren, wobei eine starke Chemilumineszenz entsteht. Dieses freiwerdende Lichtsignal der ECL-Reaktion kann anschließend durch einen Röntgenfilm oder durch einen blaulicht-sensitiven Film (Hyperfilm™ ECL) detektiert werden.

Zur Detektion der Proteine wurde die PVDF-Membran mit 125 µl/cm² einer Mischung der beiden Detektionslösungen bedeckt (A:B = 40:1, 4 - 8 ml je nach Größe des Blots), 5 min inkubiert und die Lösung wieder vollständig abgegossen. Anschließend wurde die Membran in eine transparente Folie eingeschlagen, je nach Lichtintensität zwischen 20 sek und 15 min mit einem Film bedeckt und sofort entwickelt.

Da beim ECL-System keine direkte Farbreaktion auf der Membran stattfindet, konnte mehrmals mit unterschiedlichen Erstantikörpern inkubiert werden. Um für eine weitere Analyse alle Antigen-Antikörper-Komplexe zu zerstören, wurde die Membran nach der Detektion 30 min bei 50 °C in Stripping-Puffer geschwenkt und dreimal (bei RT) für 15 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss konnte eine erneute Immunanfärbung durchgeführt werden.

<i>Stripping-Puffer</i>	<i>100 mM β-Mercaptoethanol</i>
	<i>2 % (w/v) SDS</i>
	<i>auffüllen mit 1 l TBS-T</i>

2.2.3 Analyse von Lipiden

2.2.3.1 Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

Zur Analyse der wässrig gelösten Lipide im Lungenhomogenat wurde die 1959 von Bligh & Dyer entwickelte Methode der Zweiphasenextraktion mit Chloroform und Methanol angewandt [Bligh, Dyer, 1959].

Für die Untersuchungen wurden 25 - 50 µl Lungenhomogenat mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf ein Volumen von 0,8 ml aufgefüllt. Danach gab man 3 ml eines Methanol/Chloroform-Gemisches ($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3 = 2:1 \text{ v/v}$) hinzu und schüttelte diese Mischung mehrmals in einem Zeitraum von 30 Minuten. Im folgenden zweiten Schritt erfolgte die Zugabe von 1 ml Chloroform und 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung, so dass nach mehrminütigem Schütteln die Phasentrennung erreicht wurde. Durch Zentrifugation (bei $\sim 1500 \times g$ für 10 Minuten) oder Ruhen bei 4 °C über Nacht wurde eine optimale Phasengrenze im untersuchten Lungenhomogenat erreicht. Die Chloroformphase wurde mit einer Pipette abgetrennt und unter Stickstoffstrom getrocknet.

2.2.3.2 Colorimetrische Phosphatbestimmung zur quantitativen Bestimmung des Phospholipidgehaltes

Zur Analyse des Phospholipid (PL)-Gehalts der Lungenhomogenate diente die Methode nach Rouser et al. von 1970, die im weiteren Verlauf modifiziert wurde [Schmidt 1996] und aktuell eine Detektionsgrenze von ca. 2 µg Phospholipid (entsprechend etwa 100 ng anorganischem Phosphor) ermöglicht.

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) lag in fünf aufsteigenden Konzentrationen von 0,2 µg - 5 µg Phosphor ($M_r = 31$) entsprechend 4,7 µg - 120 µg PL ($M_r = 734$, approximiert) vor und wurde als Standard verwendet.

Die nach der oben beschriebenen Methode isolierten Lipide sowie die Standards wurden mit 200 µl 70 % Perchlorsäure versetzt und 60 min bei 200 °C in einem Thermoblock verkocht. Dabei kam es zur Freisetzung der Phosphatgruppe. Nach dem Abkühlen der Proben wurde 1 ml 4,6 mM Ammoniumheptamolybdat sowie 20 µl 650 mM Ascorbinsäure hinzugegeben, letzteres bedingte die Reaktion zum Farbkomplex. Eine 45-minütige Inkubation bei 60 °C ermöglichte die vollständige Farbentwicklung (blaue Farbe).

Die Proben und Standards wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 698 \text{ nm}$ ausgemessen. Aus den Werten der ermittelten Standards konnte nach Abzug des Leerwertes über eine lineare Regression auf den Phospholipidgehalt der untersuchten Proben geschlossen werden, dabei wurde zur Berechnung eine gemittelte relative Molekularmasse von $M = 734 \text{ g/mol}$ für Phospholipide angenommen.

2.2.3.3 Analyse der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die densitometrische Methode für zeitgleiche Quantifizierung verschiedener Phospholipide basiert auf der Sichtbarmachung mit Molybdänblaureagenz. Das Prinzip besteht darin, dass aus einer flüssigen strömenden Phase heraus die Trennschubstanzen in einem Festkörper oder einer stabilisierten Flüssigkeitsphase festgehalten werden.

Alle PL-Stammlösungen lagen in einer Konzentration von 2 mg/ml in Chloroform:Methanol (2:1 v/v) vor. Die PL-Stammlösungen für Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin mussten vor dem Pipettieren aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit im Ultraschallbad beschallt und kurz auf 37 °C erwärmt werden. Danach wurde der Phospholipid-Mix (diente als PL-Standard) nach unten stehendem Schema zusammenpipettiert:

<i>PL-Mix</i>	<i>Phospholipid</i>	<i>Volumen [μl]</i>	<i>C im Mix [ng/μl]</i>
	<i>Lysophosphatidylcholin (LPC)</i>	100	166,7
	<i>Sphingomyelin (SPH)</i>	100	166,7
	<i>Phosphatidylcholin (PC), Di-Arachidoyl (Di-20:0)</i>	100	
	<i>Phosphatidylcholin (PC), Di-Palmitoyl (Di-16:0)</i>	400	PC total: 833,7
	<i>Phosphatidylserin (PS)</i>	100	166,7
	<i>Phosphatidylinositol (PI)</i>	100	166,7
	<i>Phosphatidylethanolamin (PE)</i>	100	166,7
	<i>Phosphatidylglycerol (PG)</i>	100	166,7
	<i>Cardiolipin (CL)</i>	100	166,7

PC (Di-16:0) und PC (Di-20:0) eluierten an gleicher Stelle, der Peak wurde durch die Zugabe von Di 20:0 symmetrischer.

HPTLC-Trennung von Phospholipiden aus Lungengewebe

Durch die Phosphatbestimmung der Gesamtlipid-Extraktionen (siehe Kapitel 2.2.3.2) konnte auf den Phospholipidgehalt pro μl Lungenhomogenat rechnerisch zurückgeschlossen werden. Für eine HPTLC-Trennung wurden 15 μg Phospholipide eingesetzt. Hierfür wurden die Lipide aus dem entsprechenden Volumen Lungenhomogenat isoliert (siehe Kapitel 2.2.3.1) und unter Stickstoffstrom getrocknet. Im Anschluss wurden die Lipide in 60 μL CHCl₃:MeOH (2:1 v/v) gelöst und mit einem CAMAG TLC-Applikator IV auf die Dünnschichtplatten aufgetragen.

Auf jeder Platte wurden vorher sieben verschiedene Konzentrationen des PL-Standard-Mix (enthält die Phospholipide LPC, SPH, PC, PS, PI, PE, PG, CL) aufgetragen (siehe Auftrageschema des PL-Standardmix). Da die Gesamtzahl der Bahnen auf einer DC-Platte 14 betrug, konnten in einem "Lauf" sieben Proben analysiert werden.

Auftragen des PL-Standardmix auf Platte:

<i>Bahn</i>	<i>V [μl]</i>	<i>PC [μg]</i>	<i>andere PL [μg]</i>
1	1	0,833	0,1667
2	3	2,5	0,5
3	7	5,833	1,1667
4	15	12,5	2,5
5	30	25	5
6	50	41,665	8,333
7	75	62,5	12,5

Zwecks Kammersättigung wurde ein Filterpapier (20 × 10 cm) in die Laufkammer gestellt, dieses mit Laufmittel beschickt und 1 h bei 4 °C äquilibriert.

Als Laufmittel diente ein Lösungsmittelgemisch aus Chloroform, Methanol, Essigsäure und H₂O im Verhältnis 50: 37,5: 3,5: 2.

Danach wurden die mit PL beladenen DC-Platten vertikal in die Laufkammer gestellt. Die Laufzeit/Entwicklungszeit einer DC-Platte betrug etwa 25 min. Anschließend wurde die Platte mit einem Fön getrocknet.

Die Detektion der Phospholipide erfolgte über das Molybdänblaureagenz.

Herstellung des Reagenzes

Lösung 1: 10,03 g MoO₃ + 250 ml 12,5 M H₂SO₄ wurden 15 - 30 min unter Rückfluss gekocht, bis eine klargelbe Lösung entstand (konzentrierte Schwefelsäure ist 18 M also 173,6 ml 96% Schwefelsäure + 76,4 ml Wasser = 12,5 M).

Anschließend abkühlen lassen.

Lösung 2: 125 ml von Lösung 1 wurden mit 0,445 g Mo-Pulver eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde Lösung 2 mit dem verbliebenen Volumen von Lösung 1 vereinigt und gegebenenfalls durch eine Porzellanfritte filtriert.

Danach wurde mit dem doppelten Volumen H₂O (= 500 ml) versetzt. Anschließend wurde mit konzentrierter Essigsäure bis zu einem Verhältnis Reagenz:Essigsäure 4:1 versetzt (in diesem Fall 187,5 ml).

Vor Gebrauch musste das Reagenz mindestens eine Woche stehen. Es war ungekühlt mehrere Monate funktionsfähig. Gebrauchtes Reagenz konnte mehrere Male verwendet werden.

Färbung

Die getrocknete DC-Platte wurde für zehn Sekunden vertikal in eine mit Molybdänblau-reagenz gefüllte Tauchkammer gestellt. Danach platzierte man die Platte an einem dunklen, belüfteten Ort, bis das Reagenz vollständig in die Platte eingedrungen war (10 min). Zur Entfernung überschüssigen Reagenzes wurde sie anschließend 30 Sekunden in einer flachen Schale mit Wasser behandelt. Es folgte eine weitere Trocknungsphase von 15 min an einem dunklen Ort, bis die Feuchtigkeit weitgehend in die Platte eingedrungen war. Mit einem Fön (kalt) wurde vorsichtig getrocknet, da zu starkes Trocknen und Lichteinwirkung eine Blaufärbung des Hintergrundes bedeutete. Anschließend erfolgte das Scannen mit dem TLC (*Thin Layer Chromatographie*)-Scanner bei 700 nm.

Die Auswertung der Chromatogramme (die Integration der entsprechenden Peaks/Kurvenflächen) erfolgte mit der CATS3.17-CAMAG Software (1995).

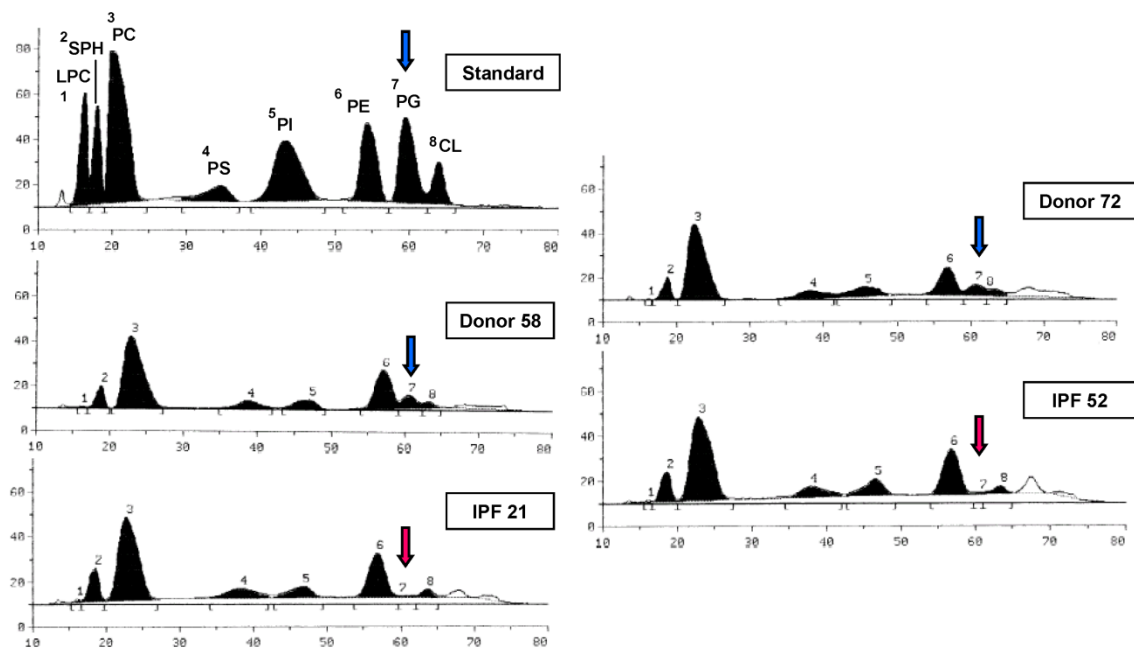


Abbildung 11: Charakteristische Chromatogramme von Lungenphospholipiden von Patienten mit IPF und Donoren

Phospholipide wurden durch Bligh-Dyer-Extraktion aus den Lungenhomogenaten isoliert und im Anschluss durch colorimetrische Bestimmung von Gesamt-Phosphat quantifiziert. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Phospholipidklassen erfolgte durch HPTLC (*high-performance thin-layer chromatography*) von 15 µg Lungengewebe phospholipid.

LPC = Lysophosphatidylcholin; SPH = Sphingomyelin; PC = Phosphatidylcholin; PS = Phosphatidylserin; PI = Phosphatidylinositol; PE = Phosphatidylethanolamin; PG = Phosphatidylglycerol; CL = Cardiolipin

2.2.4 Napsin A-Aktivitäts Assay

Die Napsin A-Aktivität wurde mit einem fluorogenen Substrat Assay unter Verwendung des Fluoreszenz-markierten Substrats MGAS-1 (QxI520-KKTSVLMAAPQ-Lys- HiLyte Fluor 488) bestimmt. Hierzu wurden Lungenhomogenate mit 0,9 % Kochsalz Lösung/ 1 mM PMSF auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml eingestellt und davon 50 µl auf eine 96-well Mikrotiterplatte transferiert. Nach Zugabe von 140 µl Reaktionspuffer (0.1 M Natriumacetat, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF und 5 mM E-64, pH 4,7) wurde die Reaktion mit der Zugabe von 10 µl des Substrates (finale Konzentration von 10 µM) gestartet.

Die durch Spaltung des Substrats entstandene Zunahme der Fluoreszenz (Exzitation: 485 nm und Emission 535 nm) wurde mit einem Mikrotiterplatten Reader (Spectrafluor Plus, in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die Napsin A-Aktivität wird in Zunahme der RFU (*relative fluorescence units*)-Einheiten pro Minute (RFU/min) angegeben und wurde computergestützt aus der Kinetikmessung bestimmt.

2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Statistische Unterschiede zwischen der IPF-, NSIP (fibrosierender Subtyp)-, COPD- und der Kontrollgruppe wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Tests analysiert. Dunn's Multiple Comparison Test wurde als post-Test verwendet. Alle statistischen Analysen wurden mittels der GraphPad Prism Version 4.0 Software durchgeführt. Die Resultate wurden bei $p < 0.05$ als signifikant betrachtet und sind in dieser Arbeit durch * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) und *** ($p < 0.001$) sowie ns (= nicht signifikant) für $p > 0.05$ gekennzeichnet.

Für die Untersuchungen lagen Lungenhomogenate von 20 Patienten mit IPF vor, die sich einer Lungentransplantation unterzogen hatten sowie von vier Patienten, denen Lungengewebe im Rahmen einer Thorakoskopie (VATS) entnommen wurde. Lungengewebe von Patienten mit fibrosierender NSIP konnte anhand von sieben verschiedenen Lungen untersucht werden, von transplantierten Patienten mit COPD standen neun Lungen für diese Arbeit zur Verfügung. Zum Vergleich dienten Lungen von zwölf Spendern.

Für die Analyse von Lavageflüssigkeiten lag das Material von zehn Patienten mit einer IPF und von acht Freiwilligen vor.

3 Ergebnisse

Das pulmonale Surfactant-System setzt sich aus Proteinen und PL zusammen. In dieser Arbeit wurden bronchoalveoläre Lavageflüssigkeiten (BALF) sowie Lungenhomogenate aus Biopsien und explantierten Lungen von Patienten mit sporadischer IPF und fibrosierender NSIP sowie COPD mit denen gesunder Probanden bzw. von Organ Spendern verglichen. Es wurden an diesen Materialien quantitative Untersuchungen hinsichtlich der Protein- und Phospholipidmengen sowie der Genexpression verschiedener Proteine durchgeführt. Abschließend wurde die Enzymaktivität einer bei der Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine beteiligten Protease bestimmt.

3.1 Analyse des Prozessierungsstatus und des Gehaltes an hydrophoben Surfactantproteinen in der BAL von IPF-Patienten

In einem ersten Schritt wurde die BAL von fünf Patienten mit sporadischer IPF mit der BAL von vier freiwilligen Spendern (FS) auf den Gehalt an maturem SP-B und SP-C sowie pro-SP-C hin untersucht (Abb. 12).

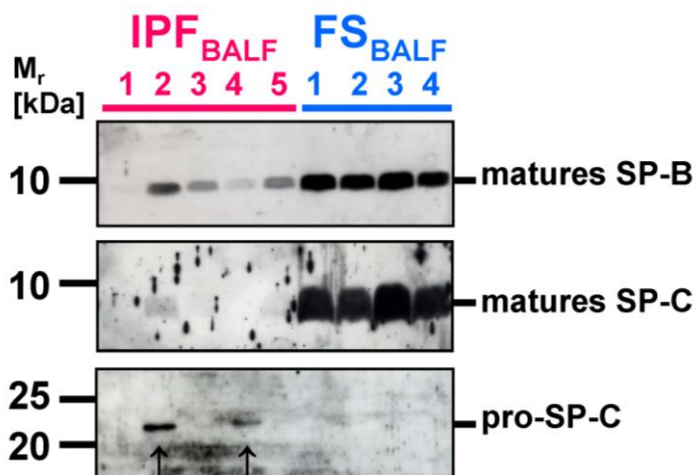


Abbildung 12: Proteingehalt der maturen Formen von SP-B und SP-C in der BAL von Patienten mit sporadischer IPF (IPF_{BALF}) im Vergleich zu Spenderlavagen (FS_{BALF})

Ein Volumen von 20 µl BAL von IPF-Patienten und Spenderlavagen wurde mit je 5 µl 4×SDS-Probenpuffer versetzt, auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel (reduzierende Bedingungen) aufgetrennt und im Anschluss geblottet. Insgesamt wurden drei Western Blots angefertigt, welche im Anschluss mit einem Antikörper gegen das mature SP-B-Protein (Verdünnung 1:500), gegen das rekombinante mature SP-C-Protein (Verdünnung 1:1000) sowie gegen das 21kDa pro-SP-C-Protein (1:500) inkubiert wurden. Als Zweitantikörper diente in allen Fällen „HRP Rabbit IgG“ in einer Verdünnung von 1:1000. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL Plus Chemilumineszenz Detektionssystem.

Im Vergleich zu Gesunden zeigte sich hierbei ein deutlich reduzierter Proteingehalt der murenen hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C bei allen fünf IPF-Lavagen (Spur 1 - 5). Weiterhin konnte bei zwei der fünf IPF-Patienten nicht-prozessiertes 21 kDa pro-SP-C nachgewiesen werden.

Weitere Proteinanalysen der BAL von zehn Patienten mit sporadischer IPF und sechs gesunden, freiwilligen Spendern zeigten ähnliche Ergebnisse (Abb. 13), mit einem deutlichen Abfall von maturem SP-B sowie einem erhöhten Gehalt von pro-SP-B-Intermediaten (N-pro-SP-B und C-pro-SP-B) bei IPF-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Bei drei Patienten mit sporadischer IPF, nicht aber bei den hier untersuchten gesunden Freiwilligen, wurde zudem eine Vorstufe des SP-C (21 kDa pro-SP-C) in deutlicher Konzentration nachgewiesen.

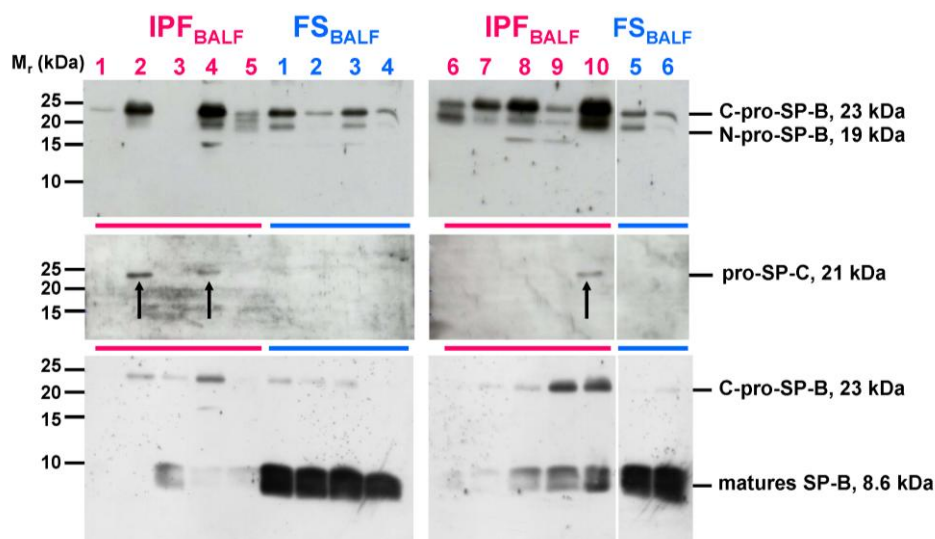


Abbildung 13: Proteingehalt von Proformen der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C sowie von maturem SP-B in der BAL von Patienten mit sporadischer IPF (IPF_{BALF}) im Vergleich zu Spenderlavagen (FS_{BALF})

Ein Volumen von 20 µl BAL von IPF-Patienten und Spenderlavagen wurde mit je 5 µl 4×SDS-Probenpuffer versetzt, auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel (reduzierende Bedingungen) aufgetrennt und im Anschluss geblottet. Insgesamt wurden drei Western Blots angefertigt, welche im Anschluss mit einem Antikörper gegen das volle Länge 42 kDa pro-SP-B-Protein (Verdünnung 1:1000), gegen das N-terminale Peptid des 21kDa pro-SP-C-Protein (Verdünnung 1:500) sowie gegen das mature SP-B-Protein (1:500) inkubiert wurden. Als Zweitantikörper diente in allen Fällen „HRP Rabbit IgG“ in einer Verdünnung von 1:1000. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL Plus Chemilumineszenz Detektionssystem.

3.2 Analyse des Prozessierungsstatus und des Gehalts an hydrophoben Surfactantproteinen und der beteiligten Proteasen in Lungenhomogenaten

Um diese ersten Erkenntnisse zu erweitern, wurde Lungengewebe von Patienten mit IPF im Vergleich zu Spenderlungen auf den Proteingehalt von SP-B und SP-C hin untersucht. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen zeigten bei Patienten mit sporadischer IPF eine unzureichende Prozessierung von SP-B auf: Wie in Abbildung 14 ersichtlich, konnte bei vier der Proben eine ausgeprägte Akkumulation des 42 kDa pro-SP-B, des 23 kDa C-pro-SP-B und des 19 kDa N-pro-SP-B sowie von niedermolekularen SP-B-Prozessierungsintermediaten beobachtet werden, was mit einem erheblich reduzierten Spiegel an maturem SP-B assoziiert war. Diese Ergebnisse waren bei quantitativer densitometrischer Auswertung aller untersuchten IPF- (n = 20), COPD- (n = 9) und Donorlungen (n = 12) hochsignifikant (siehe Anlage, Abb. 25). Parallel hierzu konnte die Reduktion von maturem SP-C beobachtet werden und das 14 kDa pro-SP-C Intermediat schien bei allen erkrankten Patienten leicht erhöht zu sein (Abb. 14).

In Übereinstimmung mit diesen Resultaten wurde eine Minderexpression der für die SP-B- und SP-C-Prozessierung maßgeblich beteiligten lysosomalen Proteasen Napsin A und Kathepsin H beobachtet (Abb. 14). Bei drei der neun IPF-Patienten war ein leichtgradig, bei den übrigen sechs Proben ein massiv reduzierter Spiegel von Napsin A nachweisbar. Bei der Protease Kathepsin H wiesen nur zwei der IPF-Proben einen ähnlichen Spiegel wie gesunde Spender auf (Abb. 14). Übereinstimmend damit ließen sich bei diesen beiden Patienten höhere Spiegel an maturem SP-C nachweisen, ebenso war die Akkumulation der nicht vollständig prozessierten Formen des Proteins SP-B weniger stark ausgeprägt.

Als Kontrollmarker für alveoläre Typ-II-Zellen diente Na^+ , K^+ -ATPase, als allgemeine Ladungskontrolle β -Aktin, ein Strukturprotein und Bestandteil des Zytoskeletts. Auf Basis der unveränderten Na^+ , K^+ -ATPase-Werte ergaben sich keine Hinweise für eine von der Kontrolle abweichende Menge an AECII bei der IPF.

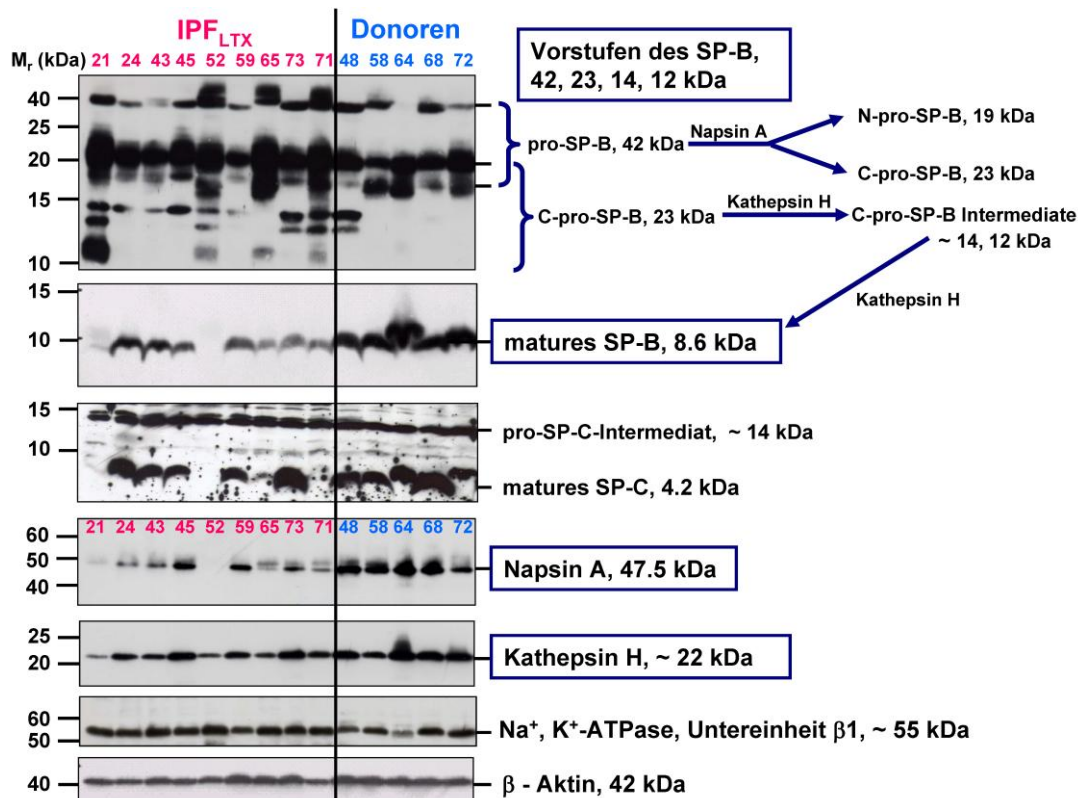


Abbildung 14: Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF

Für die Western Blot-Analysen wurden je 50 μ g Protein auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel (reduzierende Bedingungen) aufgetrennt und im Anschluss auf PVDF-Membran geblottet. Die Western Blots wurden daraufhin mit einem Antikörper gegen das volle-Länge 42kDa pro-SP-B (Verdünnung 1:3000), gegen das mature SP-B-Protein (Verdünnung 1:3000), gegen das rekombinante mature SP-C-Protein (Verdünnung 1:1000), gegen Napsin A (Verdünnung 1:1000) und gegen Kathepsin H (Verdünnung 1:500) inkubiert. Als Ladungskontrolle dienten Antikörper gegen Na⁺, K⁺-ATPase, Untereinheit Beta-1 (Verdünnung 1:1000) und Beta-Aktin (Verdünnung 1:3000). Als Zweitantikörper dienten „HRP Rabbit IgG“ (pro-SP-B, matures SP-B, matures SP-C, Na⁺, K⁺-ATPase), „HRP Goat IgG“ (Napsin A) und „HRP Mouse IgG“ (Kathepsin H, β -Aktin). Alle Zweitantikörper wurden in einer Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL Plus Chemilumineszenz Detektionssystem.

Eine exakte densitometrische Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich im Anhang (Abb. 25), die hier gewählte Darstellung stellt repräsentativ die gewonnenen Ergebnisse dar.

Da bei Patienten mit sporadischer IPF ein gravierender Mangel an maturem 8 kDa großen monomeren SP-B vorlag, stellte sich zusätzlich die Frage nach dem Grad der Dimerisierung des Proteins. Hierzu wurden sowohl ein Western Blot unter reduzierenden Bedingungen als auch ein Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt und beide mit einem Antikörper gegen das mature SP-B-Protein inkubiert. Das Ergebnis zeigte, dass der Dimerisierungsgrad von SP-B bei der IPF offensichtlich

nicht beeinträchtigt war, da sowohl erniedrigte SP-B Dimer Spiegel als auch Monomer Spiegel bei der IPF zu beobachten waren (Abb. 15).

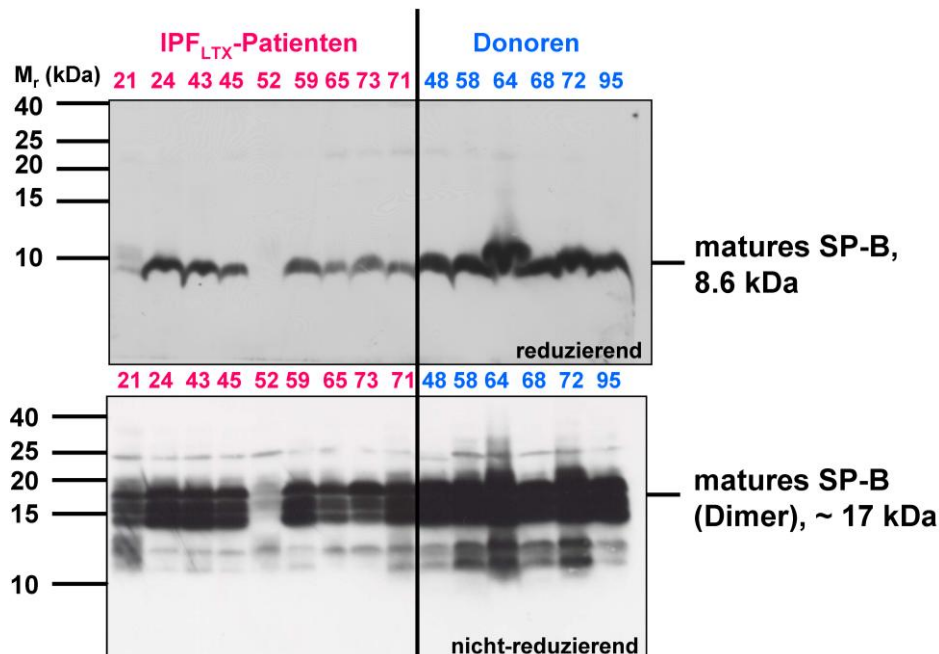


Abbildung 15: Untersuchungen zur Dimerisierung des hydrophoben Surfactantproteins SP-B in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF und Spenderlungen

Für die Analyse wurde je ein Western Blot unter reduzierenden Bedingungen sowie unter nicht-reduzierenden Bedingungen hergestellt und in beiden Fällen mit einem Antikörper gegen das mature SP-B-Protein (Verdünnung 1:3000) inkubiert. Der Zweitantikörper „HRP Rabbit IgG“ wurde in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Auf beiden SDS-Gelen (15%) wurde in jeder Spur 50 µg Protein aufgetragen.

3.3 Untersuchungen auf Genexpressionsebene

Als Nächstes wurde die Genexpression der Surfactantproteine und der lysosomalen Proteasen Napsin A und Kathepsin H untersucht.

Nach Isolierung der Gesamt-RNA, Umschreibung in cDNA mittels reverser Transkriptase und der anschließenden Polymerasekettenreaktion erfolgte die Analyse der Genexpression der SP und Proteasen durch Visualisierung der entsprechenden PCR-Produkte auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel. Die Untersuchung umfasste dabei zehn Patienten mit sporadischer IPF und sechs gesunde Kontrollen (Abb. 16).

Hierbei konnten folgende Veränderungen beobachtet werden:

- Das hydrophile SP-A zeigte keine differentielle Expression zwischen Patienten mit IPF und gesunden Spenderlungen, das heißt die Transkriptlevel waren in beiden Gruppen gleich.
- Die Genexpression der hydrophoben Surfactantproteine B und C zeigte eine deutliche Verminderung bei IPF-Patienten im Vergleich zu Donoren.
- Auch bezüglich des hydrophilen SP-D zeigte sich eine reduzierte Expression bei Patienten mit sporadischer IPF.
- Die beiden an der Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine beteiligten lysosomalen Proteasen Napsin A und Kathepsin H waren bei der IPF erheblich herunterreguliert.
- Kontrollmarker für alveoläre Typ-II-Zellen (ABCA3, Na⁺, K⁺-ATPase) wie auch für Clarazellen (CC10) ergaben keinen Hinweis auf eine differentielle zelluläre Zusammensetzung des Homogenats. Als Ladungskontrolle wurde erneut β -Aktin verwendet.

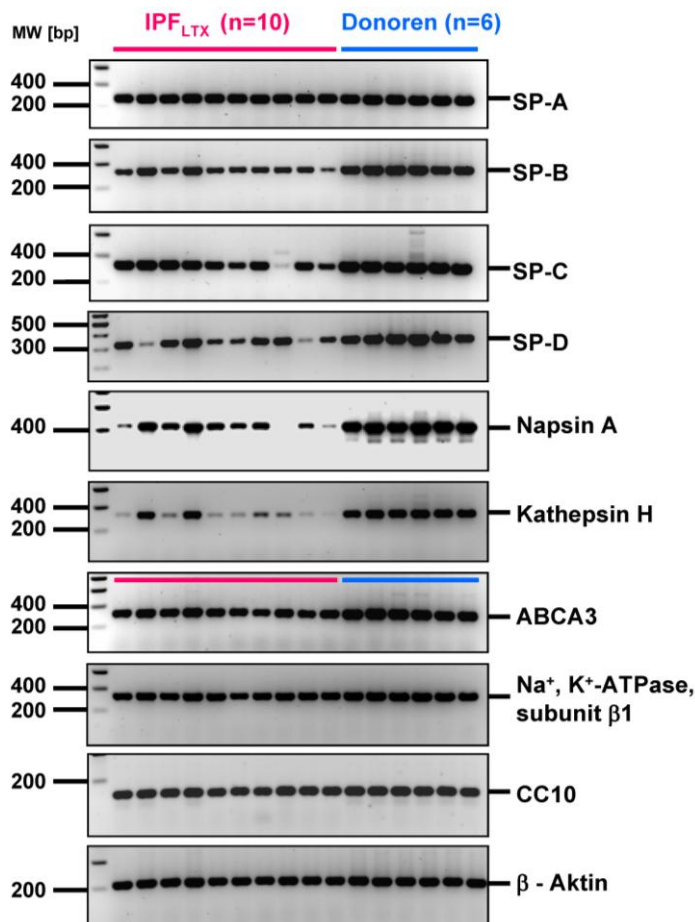


Abbildung 16: Genexpression von SP-A, SP-B, SP-C und SP-D, Napsin A und Kathepsin H, ABCA3 (Marker für Typ-II-Zellen), Na⁺, K⁺-ATPase (Marker für Typ-I- und Typ-II-Zellen), Clara-Zell-Protein CC10 (Marker für Clara-Zellen) und β-Aktin in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=10) im Vergleich zu gesunden Spendern (n=6)

Für die Analyse der Genexpression wurden 2 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und im Anschluss die PCR (30 Zyklen) mit 1/10 Volumen des cDNA-Ansatzes mit genspezifischen Primern für die angegebenen Proteine durchgeführt. Gezeigt ist hier ein Gel mit aufgetrennter, gefärbter DNA (semiquantitative RT-PCR).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der IPF die Expression von Napsin A und Kathepsin H sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptebeine erheblich reduziert war.

In einem nächsten Experiment wurde die Napsin A-Aktivität von IPF-Lungenhomogenaten im Vergleich zu COPD- und Donorlungen bestimmt.

3.4 Die Aktivität der Protease Napsin A in IPF-, COPD- und Spenderlungen

Die Analyse der Napsin A-Aktivität im Homogenat von IPF-Patienten ergab, dass die Proteaseaktivität in IPF-Lungen im Vergleich zu COPD- und Spenderlungen signifikant reduziert war (Abb. 17).

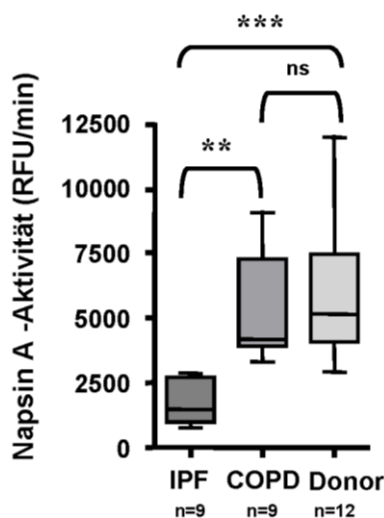


Abbildung 17: Reduzierte Napsin A-Aktivität in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=9) im Vergleich zu Patienten mit COPD (n=9) und gesunden Spenderlungen (Donor, n=12)

*** $p < 0,001$

** $p < 0,01$

ns = nicht signifikant

Die Darstellung erfolgt mittels Box-Whisker-Plot: Gezeigt sind die Box-Begrenzungen durch das obere und untere Quartil sowie der Median als horizontale Linie, die obere und untere senkrechte Linie bilden die Extremwerte ab.

RFU = relative Fluoreszenzeinheiten

3.5 Analyse der Surfactantveränderungen in Abhängigkeit des Erkrankungsstadiums

Bisher erfolgten die Analysen der verschiedenen Surfactantproteine und Proteasen an Homogenaten von explantierten Lungen, also solchen, die sich in einem Endstadium ihrer Erkrankung befanden. Es stellte sich daher die Frage, ob die Prozessierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, also in einem frühen Erkrankungsstadium, ebenfalls gestört ist. Dazu wurde der Gehalt an Surfactantproteinen aus vier explantierten Lungen (IPF_{LTx}, Spuren 1 - 4) mit denen aus vier Video-assistierten Biopsien (IPF_{VATS}, Spuren 5 - 8) verglichen, welche ein deutlich früheres Stadium der Erkrankung repräsentieren (Abb. 18). In der Summe ließen sich bei IPF-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vergleichbare Störungen der Surfactantprotein-Prozessierung darstellen wie zum Zeitpunkt bei Lungentransplantation als sehr spätes Erkrankungsstadium.

So war das mature SP-B wie auch das mature SP-C bereits bei Diagnosestellung massiv reduziert (Abb. 18).

Die Protease Napsin A schien bei Diagnosestellung lediglich leicht reduziert zu sein, der Mangel an Kathepsin H war dagegen bereits deutlich. Man kann also sagen, dass Patienten mit sporadischer IPF bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ähnliche und erhebliche Prozessierungsstörungen aufweisen wie zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung.

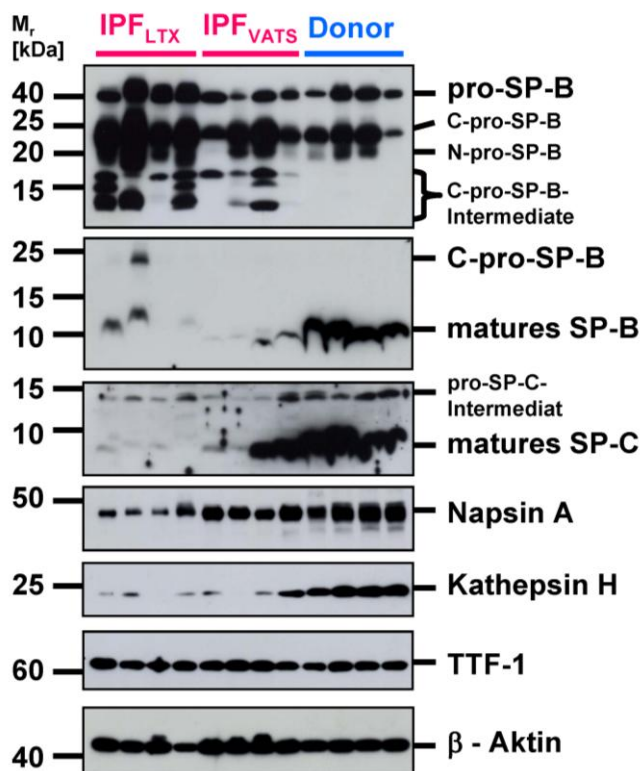


Abbildung 18: Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in Patienten mit sporadischer IPF zum Zeitpunkt der Diagnose (IPF_{VATS}; *early-stage* IPF)

Für die Western Blot-Analysen wurden je 50 µg Protein auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel (reduzierende Bedingungen) aufgetrennt und im Anschluss auf PVDF-Membran geblottet. Die Western Blots wurden daraufhin mit einem Antikörper gegen das volle-Länge 42kDa pro-SP-B (Verdünnung 1:3000), gegen das mature SP-B-Protein (Verdünnung 1:3000), gegen das rekombinante mature SP-C-Protein (Verdünnung 1:1000), gegen Napsin A (Verdünnung 1:1000) und gegen Kathepsin H (Verdünnung 1:500) inkubiert. Als Ladungskontrolle dienten Antikörper gegen TTF-1 (Verdünnung 1:2000) und Beta-Aktin (Verdünnung 1:3000). Als Zweitantikörper dienten „HRP Rabbit IgG“ (pro-SP-B, matures SP-B, matures SP-C, TTF-1), „HRP Goat IgG“ (Napsin A) und „HRP Mouse IgG“ (Kathepsin H, β-Aktin). Alle Zweitantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

3.6 Vergleich der Surfactantprotein-Prozessierung von IPF- mit NSIP (fibrosierender Subtyp)- und COPD-Patienten

Im nächsten Schritt erfolgte mittels Western Blot ein Vergleich der Surfactantprotein-Prozessierung zwischen Patienten mit IPF (n = 10), fibrosierender nicht-spezifischer interstitieller Pneumonie (NSIP; n = 7), chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD; n = 7) und Spenderlungen (n = 4).

Man konnte erkennen, dass analog zu IPF-Patienten bei allen sieben Patienten mit fibrosierender NSIP Prozessierungsstörungen des hydrophoben Surfactantproteins SP-B, mit einer Akkumulation der Proformen, vorlagen und dass bei fünf der Patienten ein erheblicher Mangel an vollständig prozessierten Protein bestand. Bei zwei NSIP-Patienten (80 und 108) wurden Proteinmengen an maturem SP-B vergleichbar denen der Spenderlungen gefunden (Abb. 19).

Ebenso lag bei der fibrosierenden NSIP – wie auch bei der IPF – eine massive Reduktion von maturem SP-C vor. Dies zeigte sich bei fünf der sieben Proben. Hier waren es erneut die Proben 80 und 108, die einen normalen Spiegel an diesem Protein aufwiesen.

Transplantierte Lungen von Patienten, die unter COPD litten, unterschieden sich hinsichtlich des Proteinlevels an pro- und maturen Formen der Surfactantproteine B und C nicht von gesunden Spenderlungen. Hier lagen also keine Prozessierungsstörungen vor.

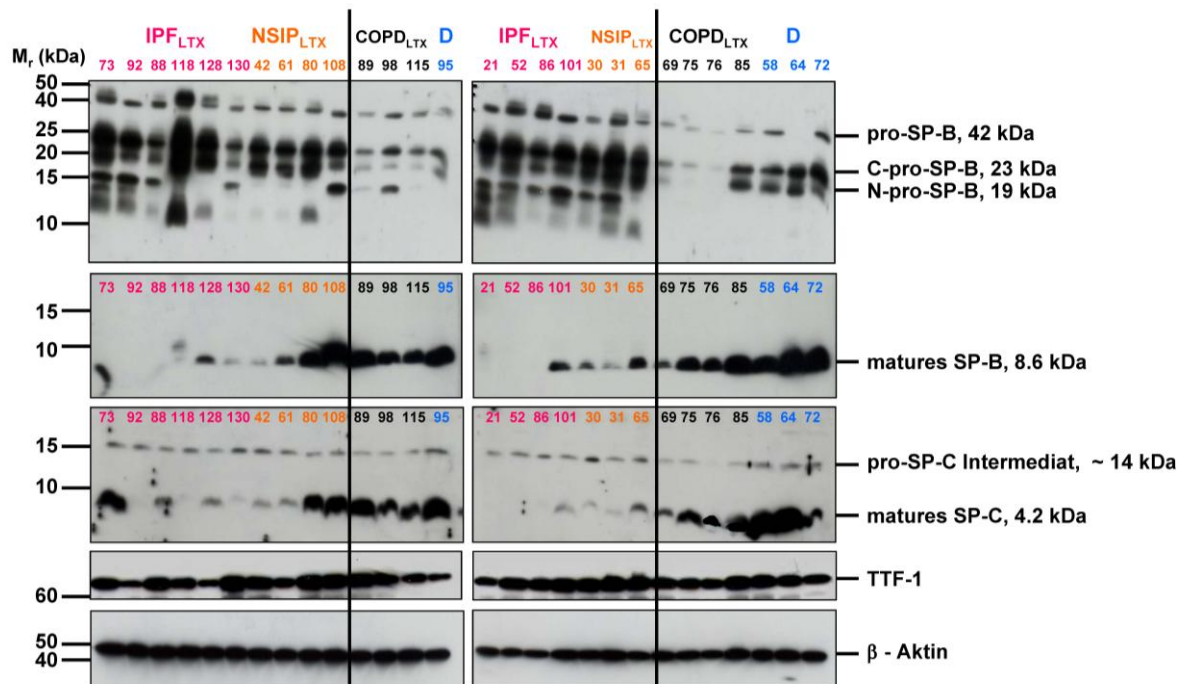


Abbildung 19: Gestörte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in beiden IIP-Entitäten IPF und fibrosierender NSIP, nicht aber in COPD- und Spenderlungen

Für die Western Blot-Analysen wurden je 50 µg Protein auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Anschluss auf PVDF-Membran geblottet. Die Western Blots (zehn in der Anzahl) wurden daraufhin mit einem Antikörper gegen das volle-Länge 42kDa pro-SP-B (Verdünnung 1:3000), gegen das mature SP-B-Protein (Verdünnung 1:3000) und gegen das rekombinante mature SP-C-Protein (Verdünnung 1:1000) inkubiert. Als Ladungskontrolle dienten Antikörper gegen TTF-1 (Verdünnung 1:2000) und Beta-Aktin (Verdünnung 1:3000). Als Zweitantikörper dienten „HRP Rabbit IgG“ (pro-SP-B, matures SP-B, matures SP-C, TTF-1) und „HRP Mouse IgG“ (β-Aktin). Alle Zweitantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL Plus Chemilumineszens Detektionssystem.

3.7 Untersuchungen zum Surfactantprotein A

Ergänzend wurde dann auch die Regulation des hydrophilen Surfactantproteins A auf Proteinebene untersucht. Es erfolgte die Analyse dieses Proteins aus Lavageflüssigkeiten und aus Lungenhomogenaten. Während auf Genebene keine Verminderung der Expression zwischen IPF und Donoren gezeigt werden konnte (s. Abschnitt 3.3, Abb. 16), zeigte die Western Blot-Analyse von SP-A aus Lavageflüssigkeiten (Abb. 20 A) und Lungenhomogenaten (Abb. 20 B) eine Reduktion des Proteins bei Patienten mit IPF im Vergleich zu freiwilligen Spendern bzw. Donorlungen.

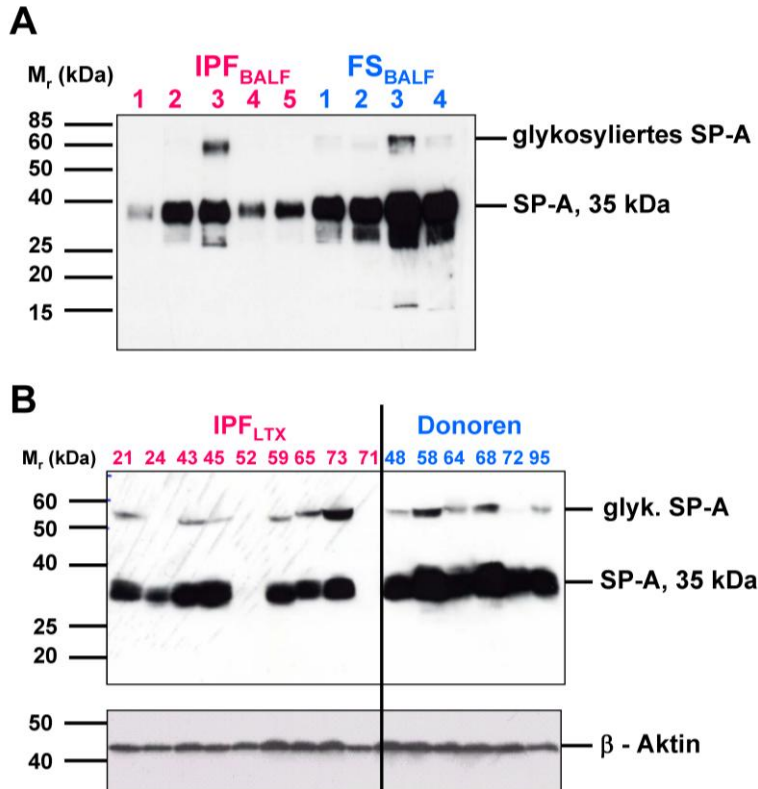


Abbildung 20: Analyse der Proteinspiegel des hydrophilen Surfactantproteins A in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF im Vergleich zu gesunden Spenderlungen. (A) Western Blot-Analyse von BAL, (B) Western Blot-Analyse von Lungengewebe

(A) Ein Volumen von 20 μ l BAL von Patienten mit sporadischer IPF und Spenderlavagen wurde mit je 5 μ l 4 \times SDS-Probenpuffer versetzt und auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Anschluss auf PVDF-Membran geblottet. Der Western Blot wurde daraufhin mit einem Antikörper gegen das volle-Länge SP-A-Protein (Verdünnung 1:500) inkubiert. Als Zweitantikörper diente „HRP Mouse IgG“ in einer Verdünnung von 1:1000. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL Plus Chemilumineszenz Detektionssystem.

(B) Für die Western Blot-Analyse wurden 50 μ g Protein auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Anschluss auf PVDF-Membran geblottet. Der Western Blot wurde anschließend mit einem Antikörper gegen das volle-Länge SP-A (Verdünnung 1:500) inkubiert. Als Ladungskontrolle wurden Antikörper gegen Beta-Aktin (Verdünnung 1:3000) verwendet. Der Zweitantikörper („HRP Mouse IgG“) wurde in beiden Fällen in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL Plus Chemilumineszenz Detektionssystem.

3.8 Veränderungen der Phospholipide

Nachdem eine Reduktion der maturen Surfactantproteine im Lungengewebe von Patienten mit IPF nachgewiesen werden konnte, schien es von Interesse, die Gesamtpospholipide im Lungengewebe von IPF, fibrosierender NSIP und COPD versus Donoren zu bestimmen.

Hierzu wurde colorimetrisch der Phospholipidgehalt der Lungenhomogenate von Patienten mit sporadischer IPF (n = 14) und fibrosierender NSIP (n = 7) sowie von Patienten mit COPD (n = 7) und gesunden Spendern (n = 8) bestimmt, verglichen und als Box-Whisker-Plot dargestellt (Abb. 21).

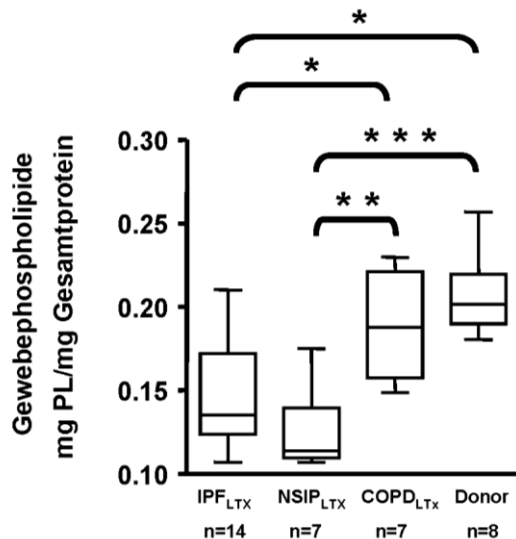


Abbildung 21: Signifikant reduzierte Konzentration an Gesamt-Phospholipiden in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF (n=14) und fibrosierender NSIP (n=7) im Vergleich zu COPD-Patienten (n=7) und gesunden Spendern (n=8)

Phospholipide wurden durch Blight-Dyer-Extraktion aus den Lungenhomogenaten isoliert und im Anschluss durch colorimetrische Bestimmung von Gesamt-Phosphat quantifiziert. Zwischen der IPF und NSIP-Gruppe sowie zwischen der COPD und Donor-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

*** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05

Dabei zeigte sich, dass der Gehalt an Gesamt-Phospholipiden bei IPF- und NSIP (fibrosierender Subtyp)-Lungen gegenüber COPD- und Spenderlungen signifikant reduziert war. Im Vergleich der Werte von Patienten mit sporadischer IPF mit denen von Patienten mit COPD und Donoren, ließ sich beiden Gruppen gegenüber eine signifikante Reduzierung der Gesamt-Phospholipide finden (p < 0,05). Die Werte an Gesamt-Phospholipiden, die man bei Patienten mit fibrosierender NSIP messen konnte, wiesen gegenüber Patienten mit COPD und Gesunden ebenfalls eine statistische Signifikanz auf (p < 0,01 bzw. p < 0,001). Dagegen fand sich zwischen den unterschiedlichen interstitiellen Lungenerkrankungen IPF und fibrosierender NSIP kein signifikanter Unterschied im Gesamt-Phospholipidgehalt der Lungen; ebenso verhielt es sich zwischen Patienten, die an COPD erkrankt waren und gesunden Spendern.

Zur genaueren Analyse der Veränderungen der Phospholipid-Fraktion wurden die Substanzklassen PC und PG, die den größten Anteil an den Surfactantlipiden bilden, mittels Dünnschichtchromatographie (*high-performance thin-layer chromatography* HPTLC) aufgetrennt und separat quantifiziert.

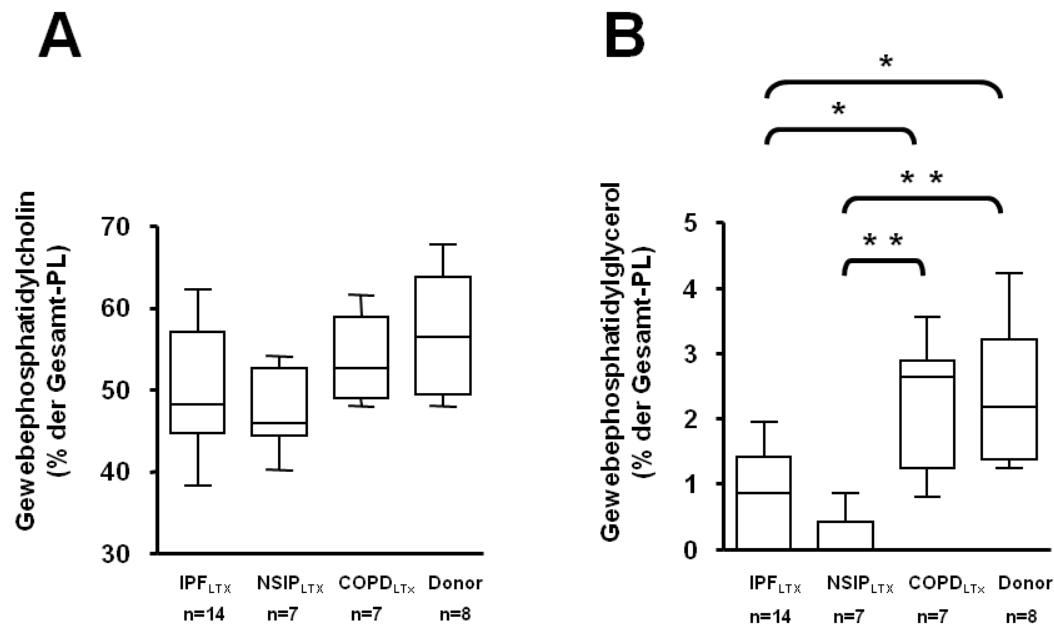


Abbildung 22: Konzentration der Surfactantphospholipide Phosphatidylcholin (PC) [A] und Phosphatidylglycerol (PG) [B] in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=14) und NSIP (n=7) im Vergleich zu COPD-Patienten (n=7) und gesunden Spendern (n=8)

Phospholipide wurden durch Blight-Dyer-Extraktion aus den Lungenhomogenaten isoliert und im Anschluss durch colorimetrische Bestimmung von Gesamt-Phosphat quantifiziert. Die quantitative Bestimmung der einzelnen Phospholipidklassen erfolgte durch HPTLC (*high-performance thin-layer chromatography*).

(A) Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von Gewebe-Phosphatidylcholin gefunden werden.

(B) Signifikante Reduktion des Phosphatidylglycerols bei Patienten mit IPF und NSIP verglichen mit COPD-Patienten und Donoren. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Der Vergleich von Gesamt-Phosphatidylcholin bei Patienten mit IPF ($n = 14$), fibrosierender NSIP ($n = 7$), COPD ($n = 7$) und Gesunden ($n = 8$) zeigte zwar verringerte Median-Werte bei Fibrose-Patienten, die Abweichungen waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 22 A). Dagegen zeigte die Gegenüberstellung des Gesamt-Phosphatidylglycerol eine signifikante Reduktion der Werte bei Patienten mit sporadischer IPF im Vergleich zu Patienten mit COPD und Gesunden ($p < 0,05$), ebenso bei Patienten mit fibrosierender NSIP; hier lag sogar ein p -Wert $< 0,01$ gegenüber den Werten für Patienten mit COPD und gesunden Spendern vor (Abb. 22 B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Mangel an Surfactant-spezifischen PL mit den Defekten in der Surfactantprotein-Prozessierung bzw. mit den dramatisch reduzierten Proteinspiegeln an maturen hydrophoben Surfactantproteinen in Einklang zu stehen scheint.

Im Anschluss wurde die Genexpression von FAT (*fatty acid translocase*)/CD36 und CCT (*CTP (Cytidintriphosphat) phosphocholine cytidyltransferase*) α in IPF-Lungen im Vergleich zu Donorlungen untersucht (Abb. 23). Das Vorhandensein dieser beiden Proteine ist von elementarer Bedeutung für die Biosynthese der PL:

FAT/CD36 ist ein membranständiges Protein, dass die Aufnahme von Palmitinsäure in die alveolären Typ-II-Zellen vermittelt und so die Grundlage für die Synthese der verschiedenen PL, hier vor allem des DPPC, darstellt.

CCT α ist ein an der *de novo*-Synthese von PC beteiligtes und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym. Ein Mangel dieses Enzyms in der Lunge geht mit einem massiven Mangel an der Synthetisierung und Sekretion von PC, dem mengenmäßig im Surfactant überwiegenden PL, einher.

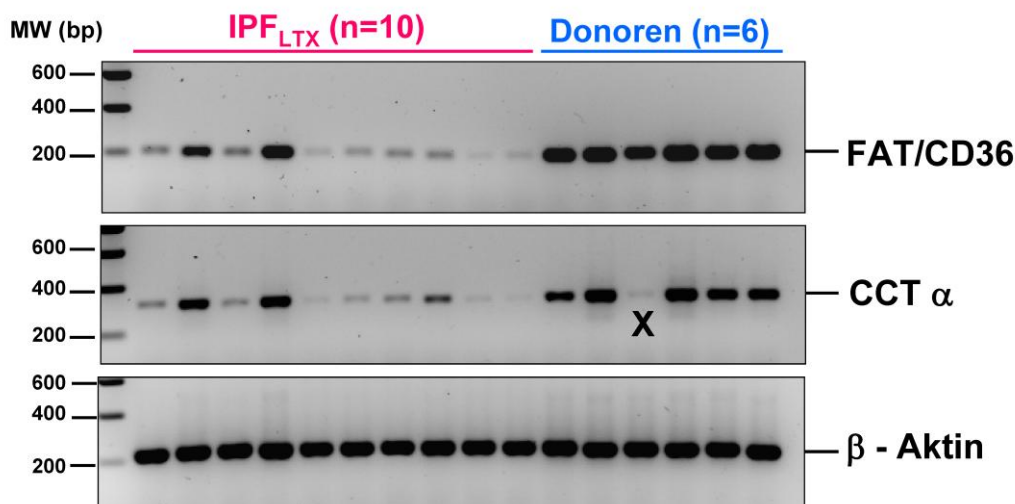


Abbildung 23: Genexpression von FAT/CD36, CCT α und β -Aktin als Ladungskontrolle in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=10) im Vergleich zu gesunden Spendern (n=6)

Für die Analyse der Genexpression wurden 2 μ g Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und im Anschluss die PCR (30 Zyklen) mit 1/10 Volumen des cDNA-Ansatzes mit genspezifischen Primern für die angezeigten Proteine durchgeführt. Gezeigt ist hier ein Gel mit aufgetrennter, gefärbter DNA (semiquantitative RT-PCR).

FAT = *fatty acid translocase*, CD = *Cluster of Differentiation*, CCT α = *CTP phosphocholine cytidyltransferase alpha*

X = Artefakt

Von beiden Proteinen wurde die Genexpression bei zehn Patienten mit sporadischer IPF zum Zeitpunkt der Transplantation mit der von sechs Donoren verglichen. Bei acht der zehn untersuchten IPF-Patienten ließ sich für beide Proteine eine massiv reduzierte Genexpression erkennen. Offensichtlich muss der Mangel an Surfactant-spezifischen PL auch auf die reduzierte Expression von FAT/CD36 und CCT α zurückgeführt werden.

4 Diskussion

4.1 Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactantproteine bei sporadischen Idiopathischen interstitiellen Pneumonien

Anstoß für diese Arbeit waren neuere Erkenntnisse, denen zufolge bei Patienten mit familiären Formen von Idiopathischen interstitiellen Pneumonien verschiedene Mutationen innerhalb des Surfactant-Systems vorliegen können. Die zuerst beschriebene Mutation betraf das hydrophobe SP-C [Nogee et al., 2001; Thomas et al., 2002]. Der Einfluss einer veränderten Surfactantzusammensetzung auf die Entstehung einer ILD konnte aufgrund der Entdeckung von ABCA3-Mutationen [Brasch et al., 2006; Young et al., 2008] sowie der beobachteten Surfactantprotein-Prozessierungsstörungen beim Hermansky-Pudlak-Syndrom [Guttentag et al., 2005] bestätigt werden. Andere Mutationen, wie die im Gen für SP-A [Wang et al., 2009], wurden parallel zu dieser Arbeit gefunden und unterstützen die Annahme, dass auch Prozessierungsstörungen der Surfactantproteine zur IPF führen könnten.

Es stellte sich also die Frage, ob Veränderungen in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Surfactantproteine auch bei Patienten mit sporadischer IPF gefunden werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher bronchoalveoläre Lavageflüssigkeiten sowie Lungenhomogenate auf ihren Gehalt an den muren Surfactantproteinen B und C sowie auf deren Prozessierungsintermediate hin untersucht. Hier ließ sich zeigen, dass die muren Formen von SP-B und SP-C bei den untersuchten Patienten mit sporadischer IPF deutlich reduziert, zum Teil sogar kaum nachweisbar waren. Als Erklärung konnte eine erheblich beeinträchtigte intrazelluläre Prozessierung dieser Proteine aufgedeckt werden, es zeigte sich gar eine prägnante Akkumulation von inkomplett prozessierten Vorstufen. So ließ sich bei fast allen Erkrankten das 21 kDa pro-SP-C sowie die Prozessierungsintermediate des SP-B, C-pro-SP-B und N-pro-SP-B, in auffallend hoher Konzentration im Gewebe wie teilweise auch in der BAL nachweisen.

Eine Übersicht über die physiologischen Abläufe bei der Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine B und C und die pathologischen Veränderungen bei Patienten mit IPF und fibrosierender NSIP zeigt Abbildung 24.

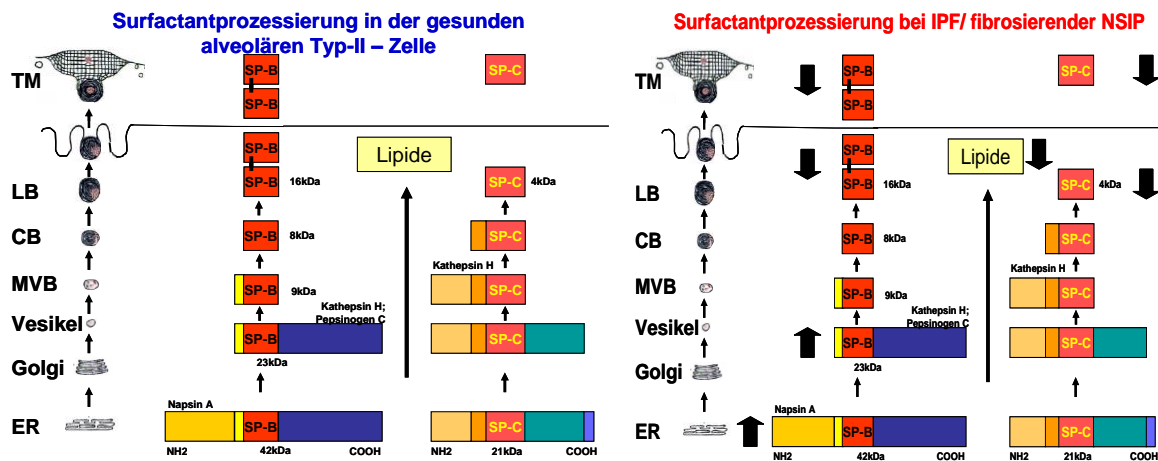


Abbildung 24: Übersicht über die Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C bei Patienten mit sporadischer IPF und fibrosierender NSIP im Vergleich zu Spenderlungen [Günther, A]

ER = Endoplasmatisches Retikulum; Golgi = Golgi-Apparat; MVB = *multivesicular bodies*/multivesikuläre Körperchen; CB = *composite bodies*; LB = *lamellar bodies*/Lamellarkörperchen; TM = Tubuläres Myelin

Diese Veränderungen in der Zusammensetzung des pulmonalen Surfactant ließen sich bei einem Großteil der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, also in einem frühen Krankheitsstadium finden. Die beobachteten Differenzen sind höchstwahrscheinlich auf einen Mangel an zwei der für die Prozessierung wesentlich zuständigen Enzyme zurückzuführen: Napsin A und Kathepsin H. Für Napsin A ließ sich zusätzlich eine verminderte Enzymaktivität nachweisen.

Des Weiteren wurde bei Patienten mit sporadischer IPF und fibrosierender NSIP eine Reduktion am Gesamtgehalt an PL sowie eine Reduktion der Surfactant-spezifischen Phospholipide PC und PG (letzteres statistisch signifikant) beobachtet.

4.2 Konsequenzen der gestörten Surfactant-Prozessierung für den Alveolarraum: Die erhöhte Oberflächenspannung

Die Hauptaufgabe von Surfactant ist die Reduktion der Oberflächenspannung an der Luft-Wasser-Grenze. Damit verringert es die Atemarbeit während der Inspiration und verhindert den Kollaps der Alveolen in der Expiration. Ferner werden die kleinen Atemwege stabilisiert und ihr Offenbleiben im Atemzyklus gewährleistet. Ein großer Anteil an der Stabilität dieses Grenzflächenfilmes wird neben DPPC als Hauptanteil der PL den hydrophoben Surfactantproteinen B und C zugesprochen [Whitsett, Weaver, 2002]. Die Beteiligung von SP-B und SP-C ermöglicht einen stabilen Surfactantfilm mit

den notwendigen Eigenschaften der raschen Mobilität von PL in der Dehnung und Kompression im Atemzyklus [Harwood 1987b; Possmayer 1991]. Zusätzlich reduzieren sie die Oberflächenspannung während der Kompression.

Wie oben gezeigt, liegen bei Patienten mit IPF reduzierte Spiegel der maturen hydrophoben Surfactantproteine B und C vor. Daraus ergibt sich für Patienten mit IPF eine erhöhte alveoläre Oberflächenspannung, wie unsere Arbeitsgruppe bereits 1999 zeigen konnte: Während eine gesunde Lunge Werte für die Oberflächenspannung nahe 0 mN/m in der Expiration erreichen kann, lag der Wert bei IPF-Patienten bei ~ 19 mN/m. Schon damals wurde vermutet, dass diese Veränderungen zu einer ausgeprägten Instabilität der Alveolen führen [Günther et al., 1999].

Erhöhte Werte der alveolären Oberflächenspannung konnten auch von Schmidt et al. bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen gezeigt werden, die Werte um 15 mN/m nachwiesen. Sie konnten nicht nur reduzierte Spiegel für PC und PG messen, sondern zeigten, dass vor allem eine reduzierte Menge von Palmitinsäure als gesättigtem Fettsäurerest des PC mit einer erhöhten Oberflächenspannung einhergeht [Schmidt et al., 2002].

Bei Patienten mit Hermansky-Pudlak-Syndrom, einer auf einer lysosomalen Transportstörung beruhenden Erkrankung, die ebenfalls zu pulmonaler Fibrose mit UIP-Muster führen kann, konnten wie auch bei der IPF erhöhte Werte für die alveoläre Oberflächenspannung gemessen werden [Mahavadi et al., 2010]. Ein Mangel an SP-B führt beim Menschen sowie im Mausmodell zu erhöhten Oberflächenspannungen um 20 mN/m [Beers et al., 2000, Melton et al., 2003].

Als logische Konsequenz ist bei den hier untersuchten Patienten mit sporadischer IPF sowie fibrosierender NSIP davon auszugehen, dass aufgrund des Fehlens Surfactant-spezifischer PL und reifer Surfactantproteine die alveoläre Oberflächenspannung deutlich erhöht ist. In der Tat wurde bei Patienten mit IPF ein erhöhter intrapulmonaler Shuntfluss gemessen [Günther et al., 2007]. Passend zu diesen pathophysiologischen Überlegungen sind bei der IPF vor allem subpleurale und basale Lungenabschnitte betroffen. Im normalen Atemzyklus gesunder Menschen sind diese den größten relativen Oberflächenveränderungen ausgesetzt, so dass hier eine physiologische Surfactantfunktion von besonderer Bedeutung ist und eine veränderte Zusammensetzung des pulmonalen Surfactant mit daraus resultierender erhöhter Oberflächenspannung an diesen Lungenabschnitten zuerst auffällig wird. Diese These wird von den Erkenntnissen unterstützt, dass in kultivierten AECII zyklisch auftretende Scherkräfte die Umwandlung epithelialer in mesenchymale Zellen (*epithelial to mesenchymal trans-*

ition EMT) sowie die Induktion einer pulmonalen Fibrose im Tiermodell auslösen können [Cabrera-Benitez et al., 2012]. Zudem führen mechanische Scherkräfte, denen eine Zelle – und hier im Besonderen die alveoläre Typ-II-Zelle im Atemzyklus – ausgesetzt ist, direkt zur Aktivierung von TGF- β . Dabei ist die Freisetzung von TGF- β effektiver bei höherer Festigkeit der extrazellulären Matrix [Buscemi et al., 2011].

4.3 ER Stress und Apoptose im Alveolarepithel als pathophysiologische Konsequenz der gestörten Surfactant-Prozessierung

Die frühere Therapie bei IPF, bestehend aus Steroiden und/oder Immunsuppressiva, führte in der Regel zu keinen messbaren Therapieerfolgen. Diese Beobachtungen, zusammen mit den oben beschriebenen Einblicken in die Veränderungen des Surfactant-Systems, wie sie bei genetischen Mutationen bei familiären Formen von IIP beschrieben werden konnten, bewirkten ein Umdenken zur Klärung des Pathomechanismus. Die als pathogenetisches Konzept zuvor favorisierte chronische Entzündung rückte in den Hintergrund, man vermutete stattdessen einen repetitiven Schaden der alveolären Typ-II-Zelle. Aufgrund der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, weiterer unpublizierter Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe sowie der Ergebnisse anderer Studien kann man schlussfolgern, dass die gestörte Surfactant-Prozessierung bei Patienten mit IPF aufgrund der intrazellulären Akkumulation von SP-B und SP-C Proteinen zum Stress des ER führt und daraus schließlich die Apoptose der alveolären Typ-II-Zelle resultiert. Hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden:

ER Stress entsteht aufgrund von verschiedensten pathophysiologischen Fehlfunktionen, darunter auch die bei der IPF beobachtete Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen [Mulugeta et al., 2005]. Durch den ER Stress kommt es zur UPR, die die Aktivierung von Chaperonen (Proteine, die die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine beschleunigen, um eine Aggregation des Proteins zu verhindern) sowie eine reduzierte Proteintranslation bewirkt, um eine weitere Akkumulation von Proteinen zu verhindern [Schröder, Kaufman, 2005; Xu et al., 2005; Lawson et al., 2008]. Wenn diese Schutzmechanismen nicht greifen und die Zellhomöostase nicht wieder hergestellt werden kann, wird die Apoptose eingeleitet, um den ungewollten und unkontrollierten Zelltod, die Nekrose, zu verhindern [Xu et al., 2005]. Es lassen sich mehrere Arbeiten finden, die einen Zusammenhang zwischen ER Stress und Apoptose der AECII als Triggermechanismus der Entstehung einer pulmonalen Fibrose zeigen konnten.

Bereits 2005 zeigten Xu et al., dass kontinuierliche Ablagerungen von fehlgefalteten Proteinen im ER die Zelle schädigen und Auslöser für die Apoptose sein können [Xu et al., 2005]. Studien an isolierten AECII konnten dies bestätigen und sowohl bei Patienten mit Mutationen im *SFTPC*-Gen und daraus resultierender pulmonaler Fibrose als auch bei Patienten mit sporadischer IPF ER Stress sowie eine gesteigerte Expression von UPR-Markern zeigen [Lawson et al., 2008]. Lawson et al. führten ursächlich nicht nur fehlerhaft prozessierte Proteine an, sondern ebenso die bei der IPF überdurchschnittlich häufig zu findenden chronischen Herpesvirus-Infektionen, für die im Zellmodell eine Induktion von ER Stress gezeigt werden konnte [Lawson et al., 2008; Isler et al., 2005]. Untersuchungen an Patienten mit Mutationen in verschiedenen Genen der Surfactantbestandteile und daraus resultierender pulmonaler Fibrose bestätigten die bisherigen Erkenntnisse. So zeigten Weichert et al., dass bei Patienten mit Mutationen im ABCA3-Transporter ER Stress entsteht und die daraus resultierende Apoptose der Pathophysiologie chronisch interstitieller Lungenerkrankungen zugrunde liegt [Weichert et al., 2011]. ER Stress entsteht hierbei auf der einen Seite durch fehlerhaft vorliegendes ABCA3, auf der anderen Seite aber auch durch die fehlerhaft prozessierten und dadurch akkumulierten Surfactantproteine. Auch Mulugeta et al. konnten dies bestätigen, indem sie bei Patienten mit angeborenen Störungen im SP-C-Gen nachwiesen, dass die Mutation nicht nur zu fehlerhaften Proteinen führt, sondern durch Akkumulation dieser Proteine ER Stress und AECII-Apoptose induziert werden können [Mulugeta et al., 2005].

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass bei Patienten mit sporadischer IPF sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Spiegel proapoptotischer Proteine signifikant erhöht sind (vor allem ATF-4, ATF-6 und CHOP) [Korfei et al., 2008]. Dies ließ sich bereits bei Patienten in einem frühen Stadium der Erkrankung, bei denen Proben mittels VATS gewonnen wurden, zeigen. Sogar in histologisch noch gesund erscheinenden Arealen von IPF-Lungen wurde eine gewisse Induktion des proapoptotischen Transkriptionsfaktors CHOP im Nukleus von AECII beobachtet [Korfei et al., 2008].

Dieser ausgeprägte ER Stress scheint die Hauptursache für die beobachtete epitheliale Apoptose zu sein, welche der aktuellen Theorie nach den Triggermechanismus für die Entwicklung der Fibrose bei der IPF darstellt [Tanjore et al., 2012]. Der Nachweis von hohen Spiegeln proapoptotischer Proteine bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung zeigt zudem, dass der apoptotische ER Stress im Alveolarepithel kein Merkmal der *end-stage* Erkrankung ist und damit nicht als Folge der fibrotischen Umbauten auftritt, sondern dessen Ursache ist.

Interessanterweise konnte im Mausmodell ein direkter Zusammenhang zwischen Gewebsverletzungen und Apoptose der AECII und interstitiellen Ablagerungen von Kollagen als histologisches Korrelat einer pulmonalen Fibrose gezeigt werden [Sisson et al., 2010]. Dies zeigt die immense Bedeutung von Schäden der alveolären Epithelzelle bei der Entstehung der pulmonalen Fibrose.

4.4 Die ungezügelte Fibroblastenproliferation in der IPF

In verletztem Gewebe kommt es im Rahmen des Heilungsprozesses zu einer Einwanderung von Fibroblasten/Myofibroblasten. Deren Aufgabe ist die Reparatur der Verletzung über Bildung extrazellulärer Matrix, insbesondere Kollagen. Dieser Reparaturvorgang resultiert normalerweise in einer Wiederherstellung der epithelialen Integrität sowie der Apoptose der Fibroblasten und dient der Beendigung der Verletzung und Wiederherstellung der physiologischen Gewebestruktur [Desmoulière et al., 1995; Hinz et al., 2001]. Bei der IPF dagegen liegen genau gegensätzliche Vorgänge vor: Die Apoptose der alveolären Epithelzellen mit gesteigerter apoptotischer Resistenz sowie unkontrollierter Proliferation der Fibroblasten [Maher et al., 2010; Hinz, 2012]. Die wichtigste Rolle kommt hierbei den Myofibroblasten zu, die zur Kontraktion fähig sind und ein dichtes Netz aus Kollagen produzieren, das bis zu 30-mal fester ist als normales Parenchym [Hinz, 2012]. Der Ursprung der Fibroblasten kann in einer lokalen Proliferation, einer Einwanderung zirkulierender Fibrozyten [Meltzer, Noble, 2008] und, nach neuen Untersuchungen, in der Umwandlung von lokalen Endothel- sowie Epithelzellen (*epithelial to mesenchymal transition* EMT) [Kim et al., 2006b; Lomas et al., 2012] liegen. TGF- β , das bei Patienten mit IPF deutlich erhöht vorliegt, kommt hier eine entscheidende Rolle zu, so ist es beteiligt an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren Aktivierung mit gesteigerter Kollagenproduktion, es inhibiert die epitheliale Zellproliferation und induziert die Umwandlung von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe [Hinz, 2012; Lomas et al., 2012, Willis et al., 2005]. Im Zellmodell führte eine TGF- β - und TNF- α -Behandlung zu einer gesteigerten Aktivität verschiedener mesenchymaler Marker, die eine Umwandlung von epithelialelem zu mesenchymalem Gewebe anzeigen [Willis et al., 2005]. Zhong et al. konnten gar zeigen, dass ER Stress direkt zur Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen führen kann [Zhong et al., 2011].

Bei Patienten mit IPF liegt weiterhin die Unfähigkeit vor, ausreichende Spiegel an COX (Cyclooxygenase)-2 zu bilden, einem Schlüsselenzym in der Prostaglandin E₂ (PGE₂) Biosynthese [Wilborn et al., 1995; Maher et al., 2010]. PGE₂ kann die Apoptose von

Fibroblasten induzieren und die AECII vor Apoptose schützen [Huang et al., 2009; Maher et al., 2010]. Durch den Mangel an PGE2 kommt es zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der alveolären Epithelzelle gegenüber der Apoptose sowie zu einer erhöhten apoptotischen Resistenz der Fibroblasten. Das Zusammenspiel aus der fehlenden Bildung von COX-2 und damit PGE2 sowie den erhöhten TGF- β -Spiegeln (als profibrotischem Marker) scheint bei Patienten mit IPF für das paradoxe Bild einer gesteigerten Apoptose von alveolären Epithelzellen sowie der apoptotischen Resistenz der Fibroblasten verantwortlich zu sein [Maher et al., 2010]. Zudem können Fibroblasten und Myofibroblasten durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, vor allem H₂O₂, selbst die Apoptose alveolärer Epithelzellen initiieren [Waghray et al., 2005].

Die Anzahl der sogenannten Fibroblastennester, welche sich bei der IPF hauptsächlich aus Myofibroblasten zusammensetzen, hat eine wichtige prognostische Relevanz: Es ließ sich hierfür eine signifikante Korrelation mit der Mortalität zeigen [King et al., 2001; Enomoto et al., 2006; Tiitto et al., 2006]. Dies unterstützt weiterhin die Hypothese, dass nicht eine primäre Entzündungskomponente der Entstehung einer IPF zugrunde liegt, sondern epithelialer Schaden gefolgt von einer zügellosen Fibroblastenproliferation [King et al., 2001].

4.5 Die reduzierte Napsin A- und Kathepsin H-Expression als mögliche Ursache der Surfactantprotein-Prozessierungsstörungen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Napsin A und Kathepsin H in sporadischen Fällen der IPF signifikant reduziert vorliegt. Die Beteiligung bei der Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine B und C lässt einen Zusammenhang zwischen den reduzierten Spiegeln der Proteasen und den in dieser Arbeit gezeigten vermindert vorliegenden maturen Proteinen vermuten.

Die Aspartatprotease Napsin A wird vor allem in der Lunge und Niere gebildet. In der Lunge findet sie sich in Alveolarmakrophagen, Clarazellen und alveolären Typ-II-Zellen, hier vor allem in den multivesikulären sowie Lamellarkörperchen [Mori et al., 2002; Ueno et al., 2004]. Napsin A ist an der Prozessierung des hydrophoben SP-B beteiligt (s. Abschnitt 1.3.2).

Die ubiquitär vorkommende Cysteinprotease Kathepsin H lässt sich in der Lunge in alveolären Typ-II-Zellen nachweisen [Ishii et al., 1991] und ist an mehreren Prozessierungsschritten von SP-B und SP-C beteiligt (s. Abschnitt 1.3.2): Bei der post-

translationalen Modifikation des SP-B an der N-terminalen Spaltung des Proproteins sowie an Prozessierungsschritten am C-terminalen Propeptid. Bei der Prozessierung von SP-C wird Kathepsin H die erste N-terminale Spaltung zugeschrieben.

Erste Untersuchungen von Kathepsin H bei der IPF durch Kimura et al. zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität dieser Protease in der BAL von Patienten verglichen mit gesunden Spendern. Gleichzeitig zeigten sie eine Korrelation mit der Anzahl an neutrophilen Granulozyten [Kimura et al., 2005]. In unseren Untersuchungen von Lungengewebe beobachteten wir dagegen reduzierte Spiegel an Kathepsin H sowohl auf Proteinebene mittels Western Blot als auch auf mRNA Ebene bei neun bzw. zehn Patienten mit IPF. Die Aktivität der Protease wurde hingegen nicht untersucht.

Über die Protease Napsin A lässt sich in der gegenwärtigen Literatur wenig finden. Woischnik et al. zeigten, dass eine Korrelation sowohl der Konzentration als auch der Aktivität von Kathepsin H und Napsin A in der BAL gegenüber der Konzentration der muren Formen von SP-B und SP-C bei der Alveolarproteinose besteht [Woischnik et al., 2008].

Im folgenden Kapitel soll geklärt werden, welche Ursachen für die Mindereexpression beider Proteasen in der IPF verantwortlich sein könnten. Daher wird nun näher auf die transkriptionale Regulation von Napsin A und Kathepsin H eingegangen.

4.6 Die transkriptionale Regulation der Surfactant-Prozessierung

Der Transkriptionsfaktor TTF (*Thyroid transcription factor*)-1 ist ein 43 kDa schweres, phosphoryliertes Protein, welches selektiv in der Lunge, im Zentralnervensystem und in der Schilddrüse exprimiert wird. TTF-1 liegt an Serin und/oder Threonin phosphoryliert vor und ist nur in der phosphorylierten Form als Transkriptionsfaktor aktiv. Bei einer Hypophosphorylierung konnte in Schilddrüsenzellen keine Expression der Zielgene von TTF-1 beobachtet werden [deFelice et al., 2003]. Über die Regulation der Genexpression von TTF-1 ist wenig bekannt, man geht davon aus, dass Glukokortikoide und TGF- β stimulierende, TNF- α inhibierende Effekte auf die TTF-1 DNA-bindende Aktivität in der Lunge haben [Boggaram, 2009].

In der Lunge findet sich TTF-1 vor allem in alveolären Typ-II-Zellen, wo es die Expression von Genen aktiviert, die für die Lungenentwicklung und -funktion benötigt werden, darunter auch die der Synthese der Surfactantproteine [Boggaram, 2009], ABCA3 [Besnard et al., 2007] und Napsin A [deFelice et al., 2003]. Dies konnten Versuche mit

genetisch veränderten Mäusen zeigen, in denen auf beiden Genabschnitten für TTF-1 sieben Serin-Reste als Träger der Phosphorylierung mutiert vorlagen: Die Expression der bisher bekannten Zielgene von TTF-1 war signifikant reduziert, während die nachweisbare Menge an TTF-1 selbst sich nicht von Gesunden unterschied. Im Einzelnen lag die SP-A mRNA stark reduziert vor, die SP-B und SP-C mRNA waren dagegen erhalten [deFelice et al., 2003]. Die Menge des 42 kDa pro-SP-B Proproteins war erhöht, was auf eine fehlerhafte Prozessierung des Proteins hindeutet [deFelice et al., 2003]. Weiter konnten deFelice et al. zeigen, dass TTF-1 auch als Transkriptionsfaktor von Napsin A fungiert, denn in den Lungenhomogenaten der mutierten Mäuse lagen reduzierte Spiegel an Napsin A vor, und zwar sowohl die mRNA als auch das Protein selbst. Kleinlein et al. zeigten in einem Reifgeborenen mit Hypothyreose und respiratorischem Versagen eine heterozygote Genmutation von TTF-1. Die Analyse der BAL zeigte reduzierte Spiegel an SP-C sowie an PL [Kleinlein et al., 2011]. Neuere Untersuchungen zeigten, dass nicht nur Hypophosphorylierungen oder Mutationen von TTF-1 selbst ursächlich sein können. So führte im Mausmodell der *knock-out* eines Transkriptionsfaktors von TTF-1 und ABCA3 (Tyrosinphosphatase Shp2) zur Apoptose epithelialer Zellen, fehlerhaft aufgebauten Lamellarkörperchen, reduzierten Surfactantproteinspiegeln und interstitieller Fibrose [Zhang et al., 2012].

Bei den von uns untersuchten Patienten und gesunden Kontrollen lagen keine reduzierten Spiegel der Gesamtmenge an TTF-1 auf Proteinebene vor. Ein Mangel dieses Transkriptionsfaktors und daraus resultierend reduzierte Spiegel an maturen Surfactantproteinen und Napsin A lässt sich für die hier durchgeführten Untersuchungen also ausschließen. Weitergehende Untersuchungen müssen zeigen, ob möglicherweise eine in dieser Arbeit nicht untersuchte Hypophosphorylierung den reduzierten Spiegeln von Surfactantproteinen und Napsin A als Zielgenen von TTF-1 zugrunde liegt.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die neben TTF-1 für eine normale Surfactanthomöostase eine elementare Rolle spielen, sind C/EBP (CCAAT/*enhancing-binding protein*) α und SREBP (*sterol regulatory element binding protein*)-1C. Diese regulieren die Lipogenese, die Synthese aller vier Surfactantproteine sowie die Synthese von ABCA3 und Napsin A. Im Mausmodell zeigte sich, dass Veränderungen in der Expression der Transkriptionsfaktoren TTF-1 und C/EBP α zu einer Beeinträchtigung der Lungenreifung mit postnatalem respiratorischen Versagen führen [deFelice et al., 2003; Martis et al., 2006]. Die Deletion von C/EBP α führte dabei zu reduzierten Mengen an ABCA3 mRNA sowie am Protein selbst [Martis et al., 2006]. Bei C/EBP α -*knock-out*-Mäusen (induzierbarer *knock-out*) konnte beobachtet werden, dass signifikant reduzierte Mengen an gesättigtem PC, reduzierte Spiegel der maturen Surfactantproteine B und C in

der BAL sowie Abnormalitäten in der Ultrastruktur der Lamellarkörperchen vorliegen [Xu et al., 2009]. Analog zu den reduzierten Spiegeln an maturen hydrophoben Surfactantproteinen waren die Spiegel an Napsin A und Kathepsin H mRNA signifikant reduziert. Diese Auffälligkeiten zeigten sich dabei erst nach hyperoxischen Bedingungen, der unter anderem oxidativen Stress auslöst [Xu et al., 2009; Zhang et al., 2004] und der auch für die IPF postuliert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Beteiligung von C/EBP α an der Regulation von Napsin A [Xu et al., 2009] und ABCA3 in AECII [Besnard et al., 2007], denn ähnliche Veränderungen in der Zusammensetzung des Surfactant ließen sich auch bei Kindern mit angeborener ABCA3-Defizienz beobachten [Brasch et al., 2006].

Andere Arbeitsgruppen konnten anhand von Genanalysen bei Patienten mit IPF eine Reduktion der aktiven Form von SREBP-1 und als Konsequenz aus dem Mangel an diesem Transkriptionsfaktor eine signifikante Herunterregulation der Zielgene des Lipidmetabolismus (darunter der LDL-Rezeptor, Fettsäuresynthase) zeigen. Diese Veränderungen waren sowohl in einem frühen Stadium als auch der *end-stage* Erkrankung zu finden [Geyer et al., 2009].

4.7 Die hydrophilen Surfactantproteine A und D bei der IPF

Die hydrophilen Surfactantproteine A und D wurden auf mRNA Ebene, SP-A zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Für SP-A fanden sich auf mRNA Ebene gleiche Mengen bei Gesunden und bei Patienten mit sporadischer IPF, die Analyse der Proteinmengen zeigte jedoch eine Reduktion bei Patienten mit IPF sowohl in der BAL als auch im Lungenhomogenat. Bei SP-D dagegen fanden sich bereits auf Transkriptebe-
ne bei fast allen untersuchten Patienten reduzierte Spiegel.

Für den Gehalt der BAL an SP-A wird eine allgemeine Reduktion dieses Proteins beschrieben. Frühere Untersuchungen unserer Gruppe konnten dies bereits zeigen [Günther et al., 1999]. Auch McCormack et al. beobachteten neben einer Reduktion der Gesamtmenge an PL eine verminderte Menge des SP-A in der BAL bei Patienten mit sporadischer IPF [McCormack et al., 1991]. Behera et al. zeigten zudem eine Korrelation zwischen der Reduktion an SP-A und einer pathologischen Lungenfunktionsprüfung [Behera et al., 2002]. Andere Untersuchungen ergaben eine erniedrigte SP-A-Phospholipid-Ratio bei Patienten mit IPF und die Korrelation einer reduzierten Ratio mit einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate [McCormack et al., 1995]. Nagata et al. konnten für Patienten mit IIP, insbesondere bei solchen mit UIP-Muster, zeigen, dass ein Mangel an SP-A in erkrankten Arealen (gekennzeichnet durch regenerative

Alveolarepithelzellen) mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [Nagata et al., 2011]. Dies deckt sich mit Untersuchungen, die eine Expression von SP-A positiven Zellen in Arealen mit geringerer Fibrose nachwiesen [Hinata et al., 2003].

Die Gruppe um Phelps wies eine signifikante Erhöhung des Spiegels an SP-A auf bis das Doppelte in BAL und Lungengewebe von Patienten mit neu diagnostizierter und daher unbehandelter IPF nach [Phelps et al., 2004]. Die Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse können in unterschiedlichen Kriterien für das Vorliegen einer IPF liegen, einer möglicherweise schon begonnenen Behandlung (Kortikosteroide inhibieren SP-A [Hoover, Floros, 1999]), Abweichungen in der Patientenpopulation oder der Methodik der Untersuchung.

Analog zu den bei uns reduziert vorliegenden SP-D-Spiegeln in der BAL und im Lungenhomogenat konnten auch andere Arbeitsgruppen reduzierte Spiegel dieses Proteins in der Lavage von Patienten mit IPF zeigen [Hartl, Griesse, 2006; Kucejko et al., 2009]. Im Mausmodell der Lungenfibrose erbrachte ein SP-D-Mangel eine gesteigerte Anzahl an Fibrozyten sowie erhöhte Spiegel von TGF- β [Aono et al., 2012], beides sind Veränderungen, die sich auch bei Patienten mit IPF finden lassen.

Da SP-A unter anderem an der Regulation einer pulmonalen Inflammation beteiligt ist, könnte ein Mangel an diesem Protein eine gesteigerte inflammatorische Reaktion durch eine Überproduktion inflammatorischer Zytokine bedingen und einen Progress der UIP zur Folge haben. Weiterhin spielen SP-A und SP-D eine herausragende Rolle in der lokalen Immunabwehr [Crouch, 1998; Crouch, Wright, 2001; Hartl, Griesse, 2006]. Die Reduktion der primär als *Host defence* Proteine fungierenden hydrophilen Surfactantproteine könnte die bei der IPF zu beobachtende Empfindlichkeit gegenüber pulmonalen Infekten erklären.

Die Serumwerte für SP-A und SP-D wurden in dieser Arbeit nicht überprüft, lassen sich in der Literatur jedoch als ein wichtiger Prognosefaktor für die Überlebensrate bei Patienten mit IPF finden [Takahashi et al., 2000]. Dabei liegt bei Erkrankten ein signifikant erhöhter Spiegel dieser Proteine im Serum vor und höhere Serumspiegel sind mit ausgeprägteren radiologischen Veränderungen sowie einer höheren Mortalität verbunden [Takahashi et al., 2000, Greene et al., 2002]. Als mögliche Gründe werden eine verstärkte Sekretion durch alveoläre Typ-II-Zellen aufgrund von Hyperplasie, ein reduzierter Abbau in der Peripherie oder eine erhöhte Durchlässigkeit zwischen Zelle und Blutbahn genannt [Greene et al., 2002; Hartl, Griesse, 2006].

4.8 Intrazelluläre Reduktion der Surfactantphospholipide bei der IPF

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit sporadischer IPF sowie bei Patienten mit fibrosierender NSIP der Gehalt der Lunge an Gesamt-Phospholipiden sowie an PG gesunden Probanden gegenüber signifikant reduziert ist. Bei PC scheint bei IPF-Patienten ebenfalls ein Mangel vorzuliegen, dieses Ergebnis war nicht statistisch signifikant. Ähnliche Ergebnisse publizierten Robinson et al. bereits 1988. Sie konnten eine signifikante Reduktion an PL in der Lavageflüssigkeit sowie geringere Spiegel für PG bei Patienten mit sporadischer IPF im Vergleich zu Gesunden nachweisen [Robinson et al., 1988]. Im selben Jahr zeigten Honda et al., dass bei Patienten mit IPF der Gehalt an PL sowie PG und DPPC in der BAL signifikant reduziert war. Für PI dagegen fand sich eine Erhöhung. Dies wurde als Zeichen des Schadens von alveolären Typ-II-Zellen und/oder metabolischer Beeinträchtigung interpretiert [Honda et al., 1988]. Auch McCormack et al. beobachteten eine reduzierte Gesamtmenge der PL bei IPF-Patienten [McCormack et al., 1991]. Unsere Arbeitsgruppe um Günther et al. wies 1999 nicht nur einen Mangel an SP-A und SP-B, sondern auch einen Mangel an PL in der BAL bei Patienten mit IPF im Vergleich zu Gesunden nach, wobei insbesondere PG und PC reduziert waren (letzteres jedoch nicht statistisch signifikant). Die Spiegel an PI, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin waren erhöht. Durch einen gesteigerten Proteingehalt der BAL von Patienten mit IPF ergab sich für die Phospholipid-Protein-Ratio eine signifikante Reduktion [Günther et al., 1999].

Schmidt et al. konnten ebenfalls eine reduzierte Phospholipid-Protein-Ratio sowie eine statistisch signifikante Reduktion der PL an PC und PG bei Patienten mit IPF nachweisen. Die übrigen PL waren erhöht. Bei näherer Untersuchung der Fettsäurereste von PC zeigte sich bei Patienten mit IPF unter anderem ein Mangel an Palmitinsäure. Ein reduzierter Gehalt an Palmitinsäureresten des PC korrelierte dabei mit einer erhöhten alveolären Oberflächenspannung [Schmidt et al., 2002].

Auch bei der interstitiellen Pneumonie beim Hermansky-Pudlak-Syndrom finden sich Veränderungen in Menge und Zusammensetzung der PL. So zeigten sich reduzierte Spiegel der Phospholipidmenge in der BAL mutierter Mäuse, im Homogenat dagegen ein Anstieg der Gesamtmenge [Mahavadi et al., 2010], dies kann man auf eine gestörte Sekretionsfähigkeit der Zelle zurückführen. Die hier auftretende interstitielle Lungenkrankung weist aufgrund ihres histopathologischen Bildes einer UIP große Ähnlichkeiten zur IPF auf.

Ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Zusammensetzung des Surfactant an PL und der Entwicklung einer pulmonalen Fibrose konnte bereits für Patienten mit Mutationen im ABCA3-Gen, einem Lipidtransporter für Phosphatidylcholin, beschrieben werden. Auch diese Patienten weisen einen erniedrigten Gesamtgehalt an PC auf, zusätzlich noch eine erhöhte Oberflächenspannung [Garmany et al., 2006] sowie ER Stress [Weichert et al., 2011].

Eine mögliche Erklärung für die reduziert vorliegende Gesamtmenge an PL könnte die hier gezeigte Reduktion der Proteine FAT/CD36 sowie CCT α sein. Beide Proteine sind bei der Synthese einzelner Phospholipidbestandteile beteiligt, FAT/CD36 vor allem bei der Synthese von Palmitinsäure [Guthmann et al., 1999], CCT α bei der Synthese von PC [Ridsdale et al., 2001; Tian et al., 2007]. In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bei Patienten mit IPF eine massive Reduktion beider Proteine auf Genebene. Dies steht im Einklang mit vorherigen Untersuchungen, die einen reduzierten Gehalt der BAL an Palmitinsäure und PC zeigten [Günther et al., 1999, Schmidt et al., 2002]. Der genaue Zusammenhang muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden, es kann jedoch vermutet werden, dass die Ursache des reduzierten Gehaltes der BALF an Palmitinsäure und PC bei IPF-Patienten in der reduzierten Genexpression der für die Synthese verantwortlichen Proteine FAT/CD36 und CCT α liegt.

4.9 Die Zusammensetzung der Surfactantproteine bei Patienten mit fibrosierender NSIP und COPD

Neben Patienten mit sporadischer IPF wurden auch Patienten mit NSIP (fibrosierender Subtyp) und COPD untersucht. Unsere Auswertungen zeigten, dass bei Patienten mit sporadischer, fibrosierender NSIP ebensolche Veränderungen zu finden sind wie bei IPF-Patienten, denn auch hier fanden sich Vorstufen des SP-B (das 42 kDa pro-SP-B, das 23 kDa C-pro-SP-B sowie das 19 kDa N-pro-SP-B), das mature SP-B dagegen war ebenso wie das mature SP-C bei fast allen NSIP-Patienten deutlich reduziert.

Bei der COPD fanden sich keine Veränderungen in der Zusammensetzung der Surfactantproteine und -lipide, sie verhielten sich analog zu gesunden Spenderlungen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Ohlmeier et al. überein, die für die hydrophoben Surfactantproteine B und C im Lungengewebe von Patienten mit COPD keine Veränderungen nachweisen konnten [Ohlmeier et al., 2008]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass bei Patienten mit COPD keine Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactantproteine vorliegen. In früheren Untersuchungen zur COPD von Fujishima et al. konnten reduzierte SP-A- und SP-D- sowie Phospholipidspiegel in der

BAL von Rauchern gefunden werden [Fujishima et al., 1999]. Eine mögliche Erklärung für das von uns differente Ergebnis könnten die damals untersuchten Patienten mit Nikotinkonsum sein. Die hier durchgeführten Untersuchungen auf nicht vollständig prozessierte Proformen findet man noch nicht in der Literatur. Daher bleiben Publikationen zwecks Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen abzuwarten.

Interessanterweise konnten Malhotra et al. in Lungengewebe von Patienten mit COPD ER Stress zeigen. Sie wiesen dabei eine Verminderung des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) nach. Hieraus resultieren eine fehlerhafte Regulation des Proteasoms sowie eine Herunterregulation von Proteinen mit antioxidativer Funktion (Peroxisomoxidoreductase, Glutathion-Peroxidase), wodurch reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Diese oxidieren Lipide und Proteine, darunter auch das Proteasom, welches in oxidiert Form eine beeinträchtigte Aktivität mit nicht mehr ausreichender Fähigkeit zur Degradation aufweist. Hierdurch sowie durch oxidierte Proteine und Lipide selbst kommt es zum ER Stress mit allen oben bereits beschriebenen Folgen (s. Abschnitt 4.3). Malhotra et al. fanden dabei eine Korrelation zwischen dem Ausmaß an ER Stress und der Schwere der COPD [Malhotra et al., 2009]. Dieser ER Stress ließ sich jedoch hauptsächlich in inflammatorischen Zellen, in Makrophagen und Becherzellen zeigen. ER Stress von alveolären Typ-II-Zellen wurde bei Patienten mit COPD nicht gezeigt.

4.10 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit IPF eine gestörte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine B und C, mit einer Akkumulation inkomplett prozessierter Vorstufen, vorliegt. Dies konnte auf eine deutliche Reduktion der Proteasen Napsin A und Kathepsin H zurückgeführt werden und führt zum Stress des Endoplasmatischen Retikulums. Hieraus scheint die Apoptose der alveolären Typ-II-Epithelzellen und die Aktivierung von Fibroblasten, mit überschießender Kollagenproduktion, zu resultieren. Weitere Untersuchungen wie zum Beispiel die Generierung von Napsin A- und Kathepsin H-*knock-out*-Mäusen sind zum Beweis dieser pathomechanistischen Sequenz erforderlich. Aus diesem tiefergehenden Verständnis der einer Entwicklung einer sporadischen IPF zugrunde liegenden Prozesse könnten sich neue Therapieansätze für Patienten mit dieser fatalen Lungenerkrankung ergeben.

5 Zusammenfassung

Die Idiopathische Pulmonale Fibrose (IPF) ist durch einen progressiven Ersatz des normalen Lungengerüsts durch fibrotisches Bindegewebe gekennzeichnet, mit einer resultierenden Zunahme der alveolo-kapillären Diffusionsstrecke und einer Abnahme der *Compliance* (Dehnbarkeit) der Lunge. Klinisch kommt es hierdurch zu Dyspnoe und zu einer zunehmenden Einschränkung der Belastbarkeit.

Vorausgegangene Untersuchungen bei familiärer IPF konnten Mutationen von Proteinen des Surfactant-Systems aufdecken, darunter Mutationen im Surfactantprotein (SP)-C, SP-A oder im Lipidtransporter ABCA3. In dieser Arbeit sollte daher die Regulation und die Prozessierung von Surfactant-Komponenten, hier v. a. der Surfactantproteine und -phospholipide, in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Lungenhomogenat von Patienten mit sporadischer IPF gemessen und mit fibrosierender NSIP, COPD und gesunden Probanden bzw. Spendern verglichen werden. Die Protein- und Genanalysen erfolgten mittels Western Blot und Polymerase-Kettenreaktion, das Phospholipidprofil wurde mit dem Verfahren der Dünnschichtchromatographie (HPTLC) bestimmt.

Im Vergleich zu den Kontrollen und zu COPD-Patienten konnte bei sporadischer IPF eine Reduktion der maturen Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-C in der BAL sowie im Lungenhomogenat dargestellt werden. Dagegen fand sich hier eine Akkumulation von pro-SP-C, C- sowie N-pro-SP-B als inkomplett prozessierte Proteinvorstufen, und zwar zum Zeitpunkt der Diagnose wie auch der Transplantation. Korrespondierend hierzu konnte eine Reduktion der für die Surfactant-Prozessierung wichtigen Enzyme Napsin A und Kathepsin H auf Protein-, im Falle von Napsin A auch auf Aktivitätsebene dargestellt werden.

Analysen der Phospholipidfraktion ergaben für die IPF und die fibrosierende NSIP signifikant reduzierte Mengen an Gesamt-Phospholipiden, Phosphatidylglycerol und auch Phosphatidylcholin, passend hierzu war auch die Expression der für die Phospholipidsynthese wichtigen Enzyme FAT/CD36 und CCT α reduziert.

Zusammenfassend lassen sich bei Patienten mit sporadischer IPF, in gewissem Umfang auch bei fibrosierender NSIP, nicht aber bei Kontrollen und COPD-Patienten, gravierende Veränderungen des Surfactant-Systems mit eingeschränkter intrazellulärer Prozessierung und gestörter Zusammensetzung nachweisen. Die Folgen dieser Störungen könnten eine Stressreaktion der alveolären Typ-II-Zelle und eine gestörte Oberflächenspannungsregulation in der Alveole sein und zu der Entwicklung einer Lungenfibrose beitragen.

6 Summary

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by a progressive replacement of the delicate lung scaffold by fibrotic connective tissue, resulting in an impaired gas exchange and decreased lung compliance. This causes dyspnea and progressive limitation in exercise capacity.

Previous studies in familial forms of IPF revealed mutations in the proteins of the surfactant system, among these the surfactant proteins (SP)-C, SP-A, or the lipid transporter ABCA3.

In this thesis focusing on sporadic forms of IPF, the regulation and processing of surfactant-components, especially the surfactant proteins and phospholipids, were analysed employing bronchoalveolar lavages (BAL) and lung homogenates and compared to fibrotic NSIP, COPD, and healthy subjects. Protein and mRNA analysis was carried out using western blotting and polymerase chain reaction. The phospholipid profile was evaluated by thin layer chromatography (HPTLC).

In comparison to fibrotic NSIP, COPD, and healthy subjects, patients with sporadic IPF showed a remarkable reduction in the mature surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C in BAL and lung homogenate.

In contrast, an accumulation of the incompletely processed proproteins pro-SP-C, C- and N-pro-SP-B was found at the time of diagnosis as well as transplantation. Simultaneously, a reduction of the relevant enzymes necessary for surfactant protein processing, napsin A and cathepsin H, could be demonstrated. For napsin A we were able to proof a reduced activity level in lung homogenate.

With regard to the phospholipid fraction, we could demonstrate a significantly reduced amount of overall phospholipids, phosphatidylglycerol and phosphatidylcholin in sporadic IPF and fibrotic NSIP. Correspondingly, we measured a reduction in the enzymes FAT/CD36 and CCT alpha, which are important for phospholipid synthesis.

In summary, patients with sporadic IPF and fibrotic NSIP showed severe changes of the surfactant system, with impaired intracellular processing and defective composition. For patients with COPD and healthy subjects, no alterations in the pulmonary surfactant system could be found.

These alterations could result in a stress reaction in type II cells and a defective surface tension regulation in the alveolus, further contributing to the development of lung fibrosis.

7 Literaturverzeichnis

- Ahuja A, Oh N, Chao W, Spragg RG, Smith RM. Inhibition of the human neutrophil respiratory burst by native and synthetic surfactant. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14(5):496-503
- American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2 Pt 1):646-64
- American Thoracic Society/European Respiratory Society. International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2):277-304
- Ansfield MJ, Kaltreider HB, Benson BJ, Shalaby MR. Canine surface active material and pulmonary lymphocyte function. Studies with mixed-lymphocyte culture. *Exp Lung Res* 1980; 1(1):3-11
- Antoniou KM, Hansell DM, Rubens MB, Marten K, Desai SR, Siafakas NM, Nicholson AG, du Bois RM, Wells AU. Idiopathic pulmonary fibrosis: outcome in relation to smoking status. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(2):190-4
- Aono Y, Ledford JG, Mukherjee S, Ogawa H, Nishioka Y, Sone S, Beers MF, Noble PW, Wright JR. Surfactant protein-D regulates effector cell function and fibrotic lung remodeling in response to bleomycin injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(5):525-36
- Auten RL, Watkins RH, Shapiro DL, Horowitz S. Surfactant apoprotein A (SP-A) is synthesized in airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 3(5):491-6
- Azuma A. Pirfenidone: antifibrotic agent for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Rev Respir Med* 2010; 4(3):301-10
- Ballard PL. Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr Rev* 1989; 10(2):165-81
- Bando M, Hosono T, Mato N, Nakaya T, Yamasawa H, Ohno S, Sugiyama Y. Long-term efficacy of inhaled N-acetylcysteine in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Intern Med* 2010; 49(21):2289-96
- Beers MF, Bates SR, Fisher AB. Differential extraction for the rapid purification of bovine surfactant protein B. *Am J Physiol* 1992; 262(6 Pt 1):L773-8
- Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO, Longmore WJ, Nogee LM, Ballard PL. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22(3):380-91
- Behera D, Kaur S, Sathyanarayana G, Majumdar S. Surfactant protein-A in lung lavage fluid obtained from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Assoc Physicians India* 2002; 50:1409-12
- Behr J, Kolb M, Cox G. Treating IPF--all or nothing? A PRO-CON debate. *Respirology* 2009; 14(8):1072-81
- Besnard V, Xu Y, Whitsett JA. Sterol response element binding protein and thyroid transcription factor-1 (Nkx2.1) regulate Abca3 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293:L1395-405
- Bi X, Flach CR, Pérez-Gil J, Plasencia I, Andreu D, Oliveira E, Mendelsohn R. Secondary structure and lipid interactions of the N-terminal segment of pulmonary surfactant SP-C in Langmuir films: IR reflection-absorption spectroscopy and surface pressure studies. *Biochemistry* 2002; 41(26):8385-95
- Boggaram V. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(1):27-35
- Border WA, Noble NA. Mechanisms of Disease: Transforming Growth Factor (Beta) in Tissue Fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331:1286-92
- Bouros D, Hatzakis K, Labrakis H, Zeibecoglou K. Association of malignancy with diseases causing interstitial pulmonary changes. *Chest* 2002; 121(4):1278-89
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37(8): 911-7

- Brasch F, Johnen G, Schauer-Vukasinovic V, Ten Brinke A, Kapp N. Napsin A is involved in the processing of proSP-C. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:A560
- Brasch F, Ten Brinke A, Johnen G, Ochs M, Kapp N, Müller KM, Beers MF, Fehrenbach H, Richter J, Batenburg JJ, Bühling F. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26(6):659-70
- Brasch F, Ochs M, Kahne T, Guttentag S, Schauer-Vukasinovic V, Derrick M, Johnen G, Kapp N, Müller KM, Richter J, Giller T, Hawgood S, Bühling F. Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II pneumocytes of the human lung. *J Biol Chem* 2003; 278(49):49006-14
- Brasch F, Johnen G, Winn-Brasch A, Guttentag SH, Schmiedl A, Kapp N, Suzuki Y, Müller KM, Richter J, Hawgood S, Ochs M. Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30(4):449-58
- Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, Boettcher A, Dada A, Schroten H, Mildenerberger E, Prueter E, Ballmann M, Ochs M, Johnen G, Griesse M, Schmitz G. Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(5):571-80
- Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(15):6642-6
- Bühling F, Kouadio M, Chwieralski CE, Kern U, Hohlfeld JM, Klemm N, Friedrichs N, Roth W, Deussing JM, Peters C, Reinheckel T. Gene targeting of the cysteine peptidase cathepsin H impairs lung surfactant in mice. *PLoS One* 2011; 6(10):e26247
- Buscemi L, Ramonet D, Klingberg F, Formey A, Smith-Clerc J, Meister JJ, Hinz B. The single-molecule mechanics of the latent TGF- β 1 complex. *Curr Biol*. 2011; 21(24):2046-54
- Cabrera-Benitez NE, Parotto M, Post M, Han B, Spieth PM, Cheng WE, Valladares F, Villar J, Liu M, Sato M, Zhang H, Slutsky AS. Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Crit Care Med* 2012; 40(2):510-7
- Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1987; 79(6):1665-73
- Catanzaro A, Richman P, Batcher S, Hallman M. Immunomodulation by pulmonary surfactant. *J Lab Clin Med* 1988; 112(6):727-34
- Chevalier G, Collet AJ. In vivo incorporation of choline- 3H, leucine- 3H and galactose- 3H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant synthesis. A quantitative radioautographic study in mouse by electron microscopy. *Anat Rec* 1972; 174(3):289-310
- Cochrane CG, Revak SD. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* 1991; 254(5031):566-8
- Copley SJ, Wells AU, Sivakumaran P, Rubens MB, Lee YC, Desai SR, MacDonald SL, Thompson RI, Colby TV, Nicholson AG, du Bois RM, Musk AW, Hansell DM. Asbestosis and idiopathic pulmonary fibrosis: comparison of thin-section CT features. *Radiology* 2003; 229(3):731-6
- Cosmi EV, Di Renzo GC. Prevention and treatment of fetal lung immaturity. *Fetal Therapy* 1989; 4 (Suppl 1):52-62
- Crapo JD, Young SL, Fram EK, Pinkerton KE, Barry BE, Crapo RO. Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128(2 Pt 2):S42-6
- Crouch E, Chang D, Rust K, Persson A, Heuser J. Recombinant pulmonary surfactant protein D. Post-translational modification and molecular assembly. *J Biol Chem* 1994a; 269(22):15808-13
- Crouch E, Persson A, Chang D, Heuser J. Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J Biol Chem* 1994b; 269(25):17311-9
- Crouch EC. Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(2):177-201

Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:521-54

Crystal RG, West JB et al.: *The Lung Bd.* 3.1.10. Raven Press, 1991, S. 247-261

Curstedt T, Johansson J, Persson P, Eklund A, Robertson B, Löwenadler B, Jörnvall H. Hydrophobic surfactant-associated polypeptides: SP-C is a lipopeptide with two palmitoylated cysteine residues, whereas SP-B lacks covalently linked fatty acyl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(8):2985-9

DeFelice M, Silberschmidt D, DiLauro R, Xu Y, Wert SE, Weaver TE, Bachurski CJ, Clark JC, Whitsett JA. TTF-1 phosphorylation is required for peripheral lung morphogenesis, perinatal survival, and tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(37):35574-83

Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CD, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, van den Bosch JM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardina M, Montanari M; IFIGENIA Study Group. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005; 353(21):2229-42

Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146(1):56-66

Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K, Nellenbogen J. Pulmonary surfactant and its components inhibit secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(4):1010-4

Eickelberg O. Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis. *FEBS Lett* 2001; 506(1):11-4

Enomoto N, Suda T, Kato M, Kaida Y, Nakamura Y, Imokawa S, Ida M, Chida K. Quantitative analysis of fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia. *Chest* 2006; 130(1):22-9

Fahim A, Crooks M, Hart SP. Gastroesophageal reflux and idiopathic pulmonary fibrosis: a review. *Pulm Med* 2011; 2011:634613

Fisher JH, Kao FT, Jones C, White RT, Benson BJ, Mason RJ. The coding sequence for the 32,000-dalton pulmonary surfactant-associated protein A is located on chromosome 10 and identifies two separate restriction-fragment-length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1987; 40(6):503-11

Fisher JH, Shannon JM, Hofmann T, Mason RJ. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the hydrophobic surfactant protein SP-C from rat: expression in alveolar type II cells and homology with SP-C from other species. *Biochim Biophys Acta* 1989; 995(3):225-30

Floros J, Wang G, Mikerov AN. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(2):125-37

Fujishima T, Takahashi H, Abe S. Cytokines and surfactant as a factor of onset and progression of COPD. *Nihon Rinsho* 1999; 57(9):1976-81

Garmany TH, Moxley MA, White FV, Dean M, Hull WM, Whitsett JA, Nogee LM, Hamvas A. Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations. *Pediatr Res* 2006; 59(6):801-5

Gehr P, Im Hof V, Geiser M, Schürch S. The mucociliary system of the lung--role of surfactants. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130(19):691-8

Gerson KD, Foster CD, Zhang P, Zhang Z, Rosenblatt MM, Guttentag SH. Pepsinogen C proteolytic processing of surfactant protein B. *J Biol Chem* 2008; 283(16):10330-8

Geyer A, Gochuico B, Kaminski N, Morse D, Rosas I. Decreased Expression of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis Genes in Lungs of Patients with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 2009; A 1912

Gillfillan AM, Rooney SA. Arachidonic acid metabolites stimulate phosphatidylcholine secretion in primary cultures of type II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 833(2):336-41

Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA. Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 1993; 48(10):959-66

Glasser SW, Korfhagen TR, Weaver TE, Clark JC, Pilot-Matias T, Meuth J, Fox JL, Whitsett JA. cDNA, deduced polypeptide structure and chromosomal assignment of human pulmonary surfactant proteolipid, SPL(pVal). *J Biol Chem* 1988a; 263(1):9-12

Glasser SW, Korfhagen TR, Perme CM, Pilot-Matias TJ, Kister SE, Whitsett JA. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid. *J Biol Chem* 1988b; 263(21):10326-31

Glasser SW, Detmer EA, Ikegami M, Na CL, Stahlman MT, Whitsett JA. Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice. *J Biol Chem* 2003; 278(16):14291-8

Gomer RH, Luper ML Jr. Investigational approaches to therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(6):737-45

Greene KE, King TE Jr, Kuroki Y, Bucher-Bartelson B, Hunninghake GW, Newman LS, Nagae H, Mason RJ. Serum surfactant proteins-A and -D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002; 19(3):439-46

Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I, Smith CJ, West J, Tata LJ. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax* 2006; 61(11):980-5

Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001; 345(7):517-25

Günther A, Schmidt R, Nix F, Yabut-Perez M, Guth C, Rosseau S, Siebert C, Grimminger F, Morr H, Velcovsky HG, Seeger W. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999; 14(3):565-73

Günther A, Ermer L, Breithacker A, Hackstein N, Eickelberg O, Morr H, Grimminger F, Velcovsky H-G, Seeger W. Klassifikation, Diagnostik und Therapie der idiopathischen interstitiellen Pneumonien: Eine kritische Bestandsaufnahme der gegenwärtig in Deutschland geübten Praxis. *Dtsch Arztebl* 2003; 100(24): A-1676 / B-1389 / C-1305

Günther A, Enke B, Markart P, Hammerl P, Morr H, Behr J, Stähler G, Seeger W, Grimminger F, Leconte I, Roux S, Ghofrani HA. Safety and tolerability of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis: an open label study. *Eur Respir J* 2007; 29(4):713-9

Günther A, von der Beck D, Markart P. Idiopathische Lungenfibrose: Diagnostik und Therapie. CME zertifizierte Fortbildung in: CME mit Partnern, Springer Verlag online, 2012

Guthmann F, Haupt R, Looman AC, Spener F, Rüstow B. Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1):L191-6

Guttentag SH, Akhtar A, Tao JQ, Atochina E, Rusiniak ME, Swank RT, Bates SR. Defective surfactant secretion in a mouse model of Hermansky-Pudlak syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33(1):14-21

Guttentag S. Posttranslational regulation of surfactant protein B expression. *Semin Perinatol* 2008; 32(5):367-70

Haagsman HP, White RT, Schilling J, Lau K, Benson BJ, Golden J, Hawgood S, Clements JA. Studies of the structure of lung surfactant protein SP-A. *Am J Physiol* 1989; 257(6 Pt 1):L421-9

Haagsman HP, Sargeant T, Hauschka PV, Benson BJ, Hawgood S. Binding of calcium to SP-A, a surfactant-associated protein. *Biochemistry* 1990; 29(38):8894-900

Hamm H, Fabel H, Bartsch W. The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives. *Clin Invest* 1992; 70(8):637-57

Hamm H, Kroegel C, Hohlfeld J. Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. *Respir Med* 1996; 90(5):251-70

Hartl D, Griesse M. Surfactant protein D in human lung diseases. *Eur J Clin Invest* 2006; 36(6):423-35

Harwood JL. Lung surfactant. *Biochem Soc Trans* 1987a; 15 Suppl:80S-89S

Harwood JL. Lung surfactant. *Prog Lipid Res* 1987b; 26(3):211-56

Hawgood S, Efrati H, Schilling J, Benson BJ. Chemical characterization of lung surfactant apoproteins: amino acid composition, N-terminal sequence and enzymic digestion. *Biochem Soc Trans* 1985; 13(6):1092-6

Hawgood S, Benson BJ, Schilling J, Damm D, Clements JA, White RT. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(1):66-70

Hawgood S, Clements JA. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* 1990; 86(1):1-6

Hinata N, Takemura T, Ikushima S, Yanagawa T, Ando T, Okada J, Oritsu M, Koike M. Phenotype of regenerative epithelium in idiopathic interstitial pneumonias. *J Med Dent Sci* 2003; 50(3):213-24

Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001; 159(3):1009-20

Hinz B. Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast. *Proc Am Thorac Soc* 2012; 9(3):137-47

Honda Y, Tsunematsu K, Suzuki A, Akino T. Changes in phospholipids in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. *Lung* 1988; 166(5):293-301

Hoover RR, Floros J. SP-A 3'-UTR is involved in the glucocorticoid inhibition of human SP-A gene expression. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 1):L917-24

Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J* 2009; 23(12):4317-26

Ishii Y, Hashizume Y, Watanabe T, Waguri S, Sato N, Yamamoto M, Hasegawa S, Kominami E, Uchiyama Y. Cysteine proteinases in bronchoalveolar epithelial cells and lavage fluid of rat lung. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(4):461-8

Isler JA, Skalet AH, Alwine JC. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *J Virol* 2005;79(11):6890-9

Jacobs HC, Ikegami M, Jobe AH, Berry DD, Jones S. Reutilization of surfactant phosphatidylcholine in adult rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1985a; 837(1):77-84

Jacobs HC, Jobe AH, Ikegami M, Jones S. Reutilization of phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine by the pulmonary surfactant system in 3-day-old rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1985b; 834(2):172-9

Jacobs KA, Phelps DS, Steinbrink R, Fisch J, Kriz R, Mitsock L, Dougherty JP, Taeusch HW, Floros J. Isolation of a cDNA clone encoding a high molecular weight precursor to a 6-kDa pulmonary surfactant-associated protein. *J Biol Chem* 1987; 262(20):9808-11

Johansson J, Curstedt T, Joernvall H. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties, and kringle similarities. *Biochemistry* 1991; 30(28):6917-21

Johansson J, Curstedt T, Robertson B. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J* 1994; 7(2):372-91

Johnson MA, Kwan S, Snell NJ, Nunn AJ, Darbyshire JH, Turner-Warwick M. Randomised controlled trial comparing prednisolone alone with cyclophosphamide and low dose prednisolone in combination in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Thorax* 1989; 44(4):280-8

Kalina M, Mason RJ, Shannon JM. Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6(6):594-600

Kim DS, Collard HR, King TE Jr. Classification and natural history of the idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 2006a; 3(4):285-92

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006b; 103(35):13180-5

Kim EJ, Collard HR, King TE Jr. Rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: the relevance of histopathologic and radiographic pattern. *Chest* 2009; 136(5):1397-405. doi: 10.1378/chest.09-0444

- Kimura M, Tani K, Miyata J, Sato K, Hayashi A, Otsuka S, Urata T, Sone S. The significance of cathepsins, thrombin and aminopeptidase in diffuse interstitial lung diseases. *J Med Invest* 2005; 52(1-2):93-100
- King RJ, Simon D, Horowitz PM. Aspects of secondary and quaternary structure of surfactant protein A from canine lung. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1001(3):294-301
- King TE Jr, Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA Jr, Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(6):1025-32
- King TE Jr, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Hormel P, Lancaster L, Noble PW, Sahn SA, Szwarcberg J, Thomeer M, Valeyre D, du Bois RM; INSPIRE Study Group. Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2009; 374(9685):222-8
- Kleinlein B, Griesse M, Liebis G, Krude H, Lohse P, Aslanidis C, Schmitz G, Peters J, Holzinger A. Fatal neonatal respiratory failure in an infant with congenital hypothyroidism due to haploinsufficiency of the NKX2-1 gene: alteration of pulmonary surfactant homeostasis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011; 96(6):F453-6
- Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Lang G, Fink L, Bohle RM, Seeger W, Weaver TE, Guenther A. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(8):838-46
- Korfhagen TR, Sheftelyevich V, Burhans MS, Bruno MD, Ross GF, Wert SE, Stahlman MT, Jobe AH, Ikegami M, Whitsett JA, Fisher JH. Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273(43):28438-43
- Kotorashvili A, Mulugeta S, Guttentag S, Beers MF. Pepsinogen C Is a Candidate Protease for Post-Translational Processing of Surfactant Protein C. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:A6265
- Kucejko W, Chyczewska E, Naumnik W, Ossolińska M. Concentration of surfactant protein D, Clara cell protein CC-16 and IL-10 in bronchoalveolar lavage (BAL) in patients with sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(2):225-30
- Kuroki Y, Mason JR, Voelker DR. Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988a; 85(15):5566-70
- Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J Biol Chem* 1988b; 263(7):3388-94
- Kuroki Y, Akino T. Roles of collagenous domain and oligosaccharide moiety of pulmonary surfactant protein A in interactions with phospholipids. *Biochem Int* 1991a; 24(2):225-33
- Kuroki Y, Shiratori M, Ogasawara Y, Tsuzuki A, Akino T. Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1991b; 1086(2):185-90
- Kuroki Y, Akino T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem* 1991c; 266(5):3068-73
- Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984; 10(3-4):203-9
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5
- Lawson WE, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB, Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB, Miller GG, Loyd JE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294(6):L1119-26
- Lawson WE, Cheng DS, Degryse AL, Tanjore H, Polosukhin VV, Xu XC, Newcomb DC, Jones BR, Roldan J, Lane KB, Morrissey EE, Beers MF, Yull FE, Blackwell TS. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(26):10562-7

Ley B, Collard HR, King TE Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(4):431-40

Lomas DA, Evans DL, Finch JT, Carrell RW. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 1992; 357(6379):605-7

Lomas NJ, Watts KL, Akram KM, Forsyth NR, Spiteri MA. Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5(1):58-71

Lu J, Willis AC, Reid KB. Purification, characterization and cDNA cloning of human lung surfactant protein D. *Biochem J* 1992; 284(Pt3):795-802

MacNee W, Rahman I. Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1995; 50 Suppl 1:S53-8

Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjodt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000; 164(11):5866-70

Magoon MW, Wright JR, Baritussio A, Williams MC, Goerke J, Benson BJ, Hamilton RL, Clements JA. Subfractionation of lung surfactant: Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta* 1983; 750(1):18-31

Mahavadi P, Korfei M, Henneke I, Liebisch G, Schmitz G, Gochuico BR, Markart P, Bellusci S, Seeger W, Ruppert C, Guenther A. Epithelial stress and apoptosis underlie Hermansky-Pudlak syndrome-associated interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(2):207-19

Maher TM, Evans IC, Bottoms SE, Mercer PF, Thorley AJ, Nicholson AG, Laurent GJ, Tetley TD, Chambers RC, McAnulty RJ. Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(1):73-82

Maitra M, Wang Y, Gerard RD, Mendelson CR, Garcia CK. Surfactant protein A2 mutations associated with pulmonary fibrosis lead to protein instability and endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2010; 285(29):22103-13

Malhotra D, Thimmulappa R, Vij N, Navas-Acien A, Sussan T, Merali S, Zhang L, Kelsen SG, Myers A, Wise R, Tudor R, Biswal S. Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the role of Nrf2-regulated proteasomal activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(12):1196-207

Martis PC, Whitsett JA, Xu Y, Perl AK, Wan H, Ikegami M. C/EBPalpha is required for lung maturation at birth. *Development* 2006; 133(6):1155-64

Massaro GD, Massaro D. Granular pneumocytes. Electron microscopic radioautographic evidence of intracellular protein transport. *Am Rev of Respir Dis* 1972; 105(6):927-31

McCormack FX, King TE Jr, Voelker DR, Robinson PC, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(1):160-6

McCormack FX, King TE Jr, Bucher BL, Nielsen L, Mason RJ. Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(2):751-9

Melton KR, Nesselin LL, Ikegami M, Tichelaar JW, Clark JC, Whitsett JA, Weaver TE. SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285(3):L543-9

Meltzer EB, Noble PW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3:8

Mori K, Shimizu H, Konno A, Iwanaga T. Immunohistochemical localization of napsin and its potential role in protein catabolism in renal proximal tubules. *Arch Histol Cytol* 2002; 65(4):359-68

Mulugeta S, Nguyen V, Russo SJ, Muniswamy M, Beers MF. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32(6):521-30

Nagata N, Kitasato Y, Wakamatsu K, Kawabata M, Fukushima K, Kajiki A, Kitahara Y, Watanabe K. Prognostic value of immunohistochemical surfactant protein A expression in regenerative/hyperplastic alveolar epithelial cells in idiopathic interstitial pneumonias. *Diagn Pathol* 2011; 6:25

- Nicholas TE, Barr HA. The release of surfactant in rat lung by brief periods of hyperventilation. *Respir Physiol* 1983; 52(1):69-83
- Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE Jr, Lancaster L, Sahn SA, Szwarzberg J, Valeyre D, du Bois RM; CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 2011; 377(9779):1760-9
- Nogee LM, Dunbar AE 3rd, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2001; 344(8):573-9
- Notter RH, Shapiro DL, Ohning B, Whitsett JA. Biophysical activity of synthetic phospholipids combined with purified lung surfactant 6000 dalton apoprotein. *Chem Phys Lipids* 1987; 44(1):1-17
- Ohlmeier S, Vuolanto M, Toljamo T, Vuopala K, Salmenkivi K, Myllärniemi M, Kinnula VL. Proteomics of human lung tissue identifies surfactant protein A as a marker of chronic obstructive pulmonary disease. *J Proteome Res* 2008; 7(12):5125-32
- Oyarzun MJ, Clements JA, Baritussio A. Ventilation enhances pulmonary alveolar clearance of radioactive dipalmitoylphosphatidylcholine in liposomes. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121(4):709-21
- Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(12):1534-8
- Pastrana B, Mautone AJ, Mendelsohn R. Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids. *Biochemistry* 1991; 30(41):10058-64
- Persson A, Chang D, Rust K, Moxley M, Longmore W, Crouch E. Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein. *Biochemistry* 1989; 28(15):6361-7
- Persson A, Chang D, Crouch E. Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* 1990; 265(10):5755-60
- Phelps DS, Floros J, Taeusch HW Jr. Post-translational modification of the major human surfactant-associated proteins. *Biochem J* 1986; 237(2):373-7
- Phelps DS, Floros J. Localization of surfactant protein synthesis in human lung by in situ hybridization. *Am Rev Respir Dis* 1988a; 137(4):939-42
- Phelps DS, Floros J. Proline hydroxylation alters the electrophoretic mobility of pulmonary surfactant-associated protein A. *Electrophoresis* 1988b; 9(5):231-3
- Phelps DS, Umstead TM, Mejia M, Carrillo G, Pardo A, Selman M. Increased surfactant protein-A levels in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2004; 125(2):617-25
- Pilot-Matias TJ, Kister SE, Fox JL, Kropp K, Glasser SW, Whitsett JA. Structure and organization of the gene encoding human pulmonary surfactant proteolipid SP-B. *DNA* 1989; 8(2):75-86
- Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138(4):990-8
- Possmayer F. The role of surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(4):749-52
- Possmayer F. Biophysical activity of pulmonary surfactant. In: *Fetal and Neonatal Physiology* (Polin FA, Fox WW, Hrsg.); Bd. 90, Sanders WB, Philadelphia 1991; 459-962
- Possmayer F, Nag K, Rodriguez K, Qanbar R, Schürch S. Surface activity in vitro: role of surfactant proteins. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 129(1):209-20
- Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, Starko K, Noble PW, Schwartz DA, King TE Jr; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Study Group. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004; 350(2):125-33
- Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(7):810-6

- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bours D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schünemann HJ; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(6):788-824
- Revak SD, Merritt TA, Degryse E, Stefani L, Courtney M, Hallman M, Cochrane CG. Use of human surfactant low molecular weight apoproteins in the reconstitution of surfactant biologic activity. *J Clin Invest* 1988; 81(3):826-33
- Revak SD, Merritt TA, Hallman M, Heldt G, La Polla RJ, Hoey K, Houghten RA, Cochrane CG. The use of synthetic peptides in the formation of biophysically and biologically active pulmonary surfactants. *Pediatr Res* 1991; 29(5):460-5
- Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett JA. Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol* 1987; 63(2):692-8
- Richeldi L, Costabel U, Selman M, Kim DS, Hansell DM, Nicholson AG, Brown KK, Flaherty KR, Noble PW, Raghu G, Brun M, Gupta A, Juhel N, Klüglich M, du Bois RM. Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011; 365(12):1079-87
- Ridsdale R, Tseu I, Wang J, Post M. CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha is a cytosolic protein in pulmonary epithelial cells and tissues. *J Biol Chem* 2001; 276(52):49148-55
- Robinson PC, Watters LC, King TE, Mason RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis. Abnormalities in bronchoalveolar lavage fluid phospholipids. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137(3):585-91
- Rooney SA. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131(3):439-60
- Rooney SA, Gobran LI. Adenosine and leukotrienes have a regulatory role in lung surfactant secretion in the newborn rabbit. *Biochim Biophys Acta* 1988; 960(1):98-106
- Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970; 5(5):494-6
- Rust K, Grosso L, Zhang V, Chang D, Persson A, Longmore W, Cai GZ, Crouch E. Human surfactant protein D: SP-D contains a C-type lectin carbohydrate recognition domain. *Arch Biochem Biophys* 1991; 290(1):116-26
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487-91
- Schmidt R. Entwicklung von Methoden zur biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung des pulmonalen Surfactants. VVB Laufersweiler Verlag, 1996
- Schmidt R, Meier U, Markart P, Grimminger F, Velcovsky HG, Morr H, Seeger W, Günther A. Altered fatty acid composition of lung surfactant phospholipids in interstitial lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283(5):L1079-85
- Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:739-89
- Schweisfurth H, Kieslich C, Satake N, Loddenkemper R, Schönfeld N, Mäder I, Treutler D, Matthiessen W, Schmidt C, Leonhardt P, Simon G, deWall N, Gereke U, Costabel U. How are interstitial lung diseases diagnosed in Germany? Results of the scientific registry for the exploration of interstitial lung diseases ("Fibrosis registry") of the WATL. *Pneumologie* 2003; 57(7):373-82
- Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3):L562-74

- Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: Prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134(2):136–51
- Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(4):364-72
- Shigemitsu H, Azuma A. Sarcoidosis and interstitial pulmonary fibrosis; two distinct disorders or two ends of the same spectrum. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17(5):303-7. doi: 10.1097/MCP.0b013e3283486d52
- Sisson TH, Mendez M, Choi K, Subbotina N, Courey A, Cunningham A, Dave A, Engelhardt JF, Liu X, White ES, Thannickal VJ, Moore BB, Christensen PJ, Simon RH. Targeted injury of type II alveolar epithelial cells induces pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(3):254-63
- Speer CP, Götze B, Curstedt T, Robertson B. Phagocytic functions and tumor necrosis factor secretion of human monocytes exposed to natural porcine surfactant (Curosurf). *Pediatr Res* 1991; 30(1):69-74
- Spissinger T, Schäfer KP, Voss T. Assembly of the surfactant protein SP-A. Deletion in the globular domain interfere with the correct folding of the molecule. *Eur J Biochem* 1991; 199(1):65-71
- Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* 2005; 128(5 Suppl 1):526S-532S
- Stults JT, Griffin PR, Lesikar DD, Naidu A, Moffat B, Benson BJ. Lung surfactant protein SP-C from human, bovine, and canine sources contains palmitoyl cysteine thioester linkages. *Am J Physiol* 1991; 261(2 Pt 1):L118-25
- Takahashi H, Fujishima T, Koba H, Murakami S, Kurokawa K, Shibuya Y, Shiratori M, Kuroki Y, Abe S. Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(3 Pt 1):1109-14
- Tanaka Y, Takei T, Aiba T, Masuda K, Kiuchi A, Fujiwara T. Development of synthetic lung surfactants. *J Lipid Res* 1986; 27(5):475-85
- Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2010; 35(4):821-9
- Tanjore H, Blackwell TS, Lawson WE. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302(8):L721-9
- Thomas AQ, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(9):1322-8
- Thomassen MJ, Meeker DP, Antal JM, Connors MJ, Wiedemann HP. Synthetic surfactant (Exosurf) inhibits endotoxin-stimulated cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7(3):257-60
- Tian Y, Zhou R, Rehg JE, Jackowski S. Role of phosphocholine cytidyltransferase alpha in lung development. *Mol Cell Biol* 2007; 27(3):975-82
- Tiitto L, Bloigu R, Heiskanen U, Pääkkö P, Kinnula VL, Kaarteenaho-Wiik R. Relationship between histopathological features and the course of idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia. *Thorax* 2006; 61(12):1091-5
- Ueno T, Linder S, Na CL, Rice WR, Johansson J, Weaver TE. Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *J Biol Chem* 2004; 279(16):16178-84
- Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 1998; 275(6 Pt 1):L1192-9

- Vamvakopoulos NC, Modi WS, Floros J. Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein B gene (SFTP3) to chromosome 2p12 → p11.2. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68(1-2):8-10
- Veldhuizen RA, Inchley K, Hearn SA, Lewis JF, Possmayer F. Degradation of surfactant-associated protein B (SP-B) during in vitro conversion of large to small surfactant aggregates. *Biochem J* 1993; 295(Pt1):141-7
- Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Weaver TE, Whitsett JA, Van Golde LMG, Geuze HJ. Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment. *Am J Physiol* 1992; 263(4 Pt 1):L479-86
- Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, Thannickal VJ. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J* 2005; 19(7):854-6
- Wang R, Ibarra-Sunga O, Verlinski L, Pick R, Uhal BD. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(1):L143-51
- Wang WJ, Russo SJ, Mulugeta S, Beers MF. Biosynthesis of surfactant protein C (SP-C). Sorting of SP-C proprotein involves homomeric association via a signal anchor domain. *J Biol Chem* 2002; 277(22):19929-37
- Wang WJ, Mulugeta S, Russo SJ, Beers MF. Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggresome formation and generation of a dominant negative. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 4):683-92
- Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, DiMaio JM, Kinch LN, Grishin NV, Garcia CK. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009; 84(1):52-9
- Weichert N, Kaltenborn E, Hector A, Woischnik M, Schams A, Holzinger A, Kern S, Griesse M. Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. *Respir Res* 2011; 12:4
- Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* 1994; 2(12):1227-40
- White RT, Damm D, Miller J, Spratt K, Schilling J, Hawgood S, Benson B, Cordell B. Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Natur* 1985; 317(6035):361-3
- Whitsett JA, Hull W, Ross G, Weaver T. Characteristics of human surfactant-associated glycoproteins A. *Pediatr Res* 1985; 19(5):501-8
- Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 2002; 347(26):2141-8
- Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1995; 95(4):1861-8
- Williams MC. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *J Cell Biol* 1977; 72(2):260-77
- Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005; 166(5):1321-32
- Woischnik M, Bauer A, Aboutaam R, Pamir A, Stanzel F, de Blic J, Griesse M. Cathepsin H and napsin A are active in the alveoli and increased in alveolar proteinosis. *Eur Respir J* 2008; 31(6):1197-204
- Wright JR, Wager RE, Hamilton RL, Huang M, Clements JA. Uptake of lung surfactant sub-fractions into lamellar bodies of adult rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1986; 60(3):817-25
- Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136(2):426-44

- Wright JR, Borchelt JD, Hawgood S. Lung surfactant apoprotein AP-A (26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(14):5410-4
- Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77(4):931-62
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; 115(10):2656-64
- Xu Y, Saegusa C, Schehr A, Grant S, Whitsett J, Ikegami M. C/EBP α is required for pulmonary cytoprotection during hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297(2): L286–98
- Yi ES. Hypersensitivity pneumonitis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39(6):581-629
- Young SL, Fram EK, Craig BL. Three-dimensional reconstruction and quantitative analysis of rat lung type II cells: a computer-based study. *Am J Anat* 1985; 174(1):1-14
- Young LR, Nogee LM, Barnett B, Panos RJ, Colby TV, Deutsch GH. Usual interstitial pneumonia in an adolescent with ABCA3 mutations. *Chest* 2008; 134(1):192-5
- Yu SH, Possmayer F. Effect of pulmonary surfactant protein B (SP-B) and calcium on phospholipid adsorption and squeeze-out of phosphatidylglycerol from binary phospholipid monolayers containing dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1126(1):26-34
- Zhang F, Pan T, Nielsen LD, Mason RJ. Lipogenesis in fetal rat lung: importance of C/EBP α , SREBP-1c, and stearoyl-CoA desaturase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30(2):174-83
- Zhang X, Zhang Y, Tao B, Teng L, Li Y, Cao R, Gui Q, Ye M, Mou X, Cheng H, Hu H, Zhou R, Wu X, Xie Q, Ning W, Lai M, Shen H, Feng GS, Ke Y. Loss of Shp2 in alveoli epithelia induces deregulated surfactant homeostasis, resulting in spontaneous pulmonary fibrosis. *FASEB J* 2012; 26(6):2338-50
- Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999; 341(17):1264-9
- Zhong Q, Zhou B, Ann DK, Minoo P, Liu Y, Banfalvi A, Krishnaveni MS, Dubourd M, Demaio L, Willis BC, Kim KJ, duBois RM, Crandall ED, Beers MF, Borok Z. Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45(3):498-509

8 Anhang

8.1 Quantitative Auswertungen

Repräsentative und quantitative Auswertungen der Analysen der hydrophoben Surfactantproteine und der an der Prozessierung beteiligten Proteasen

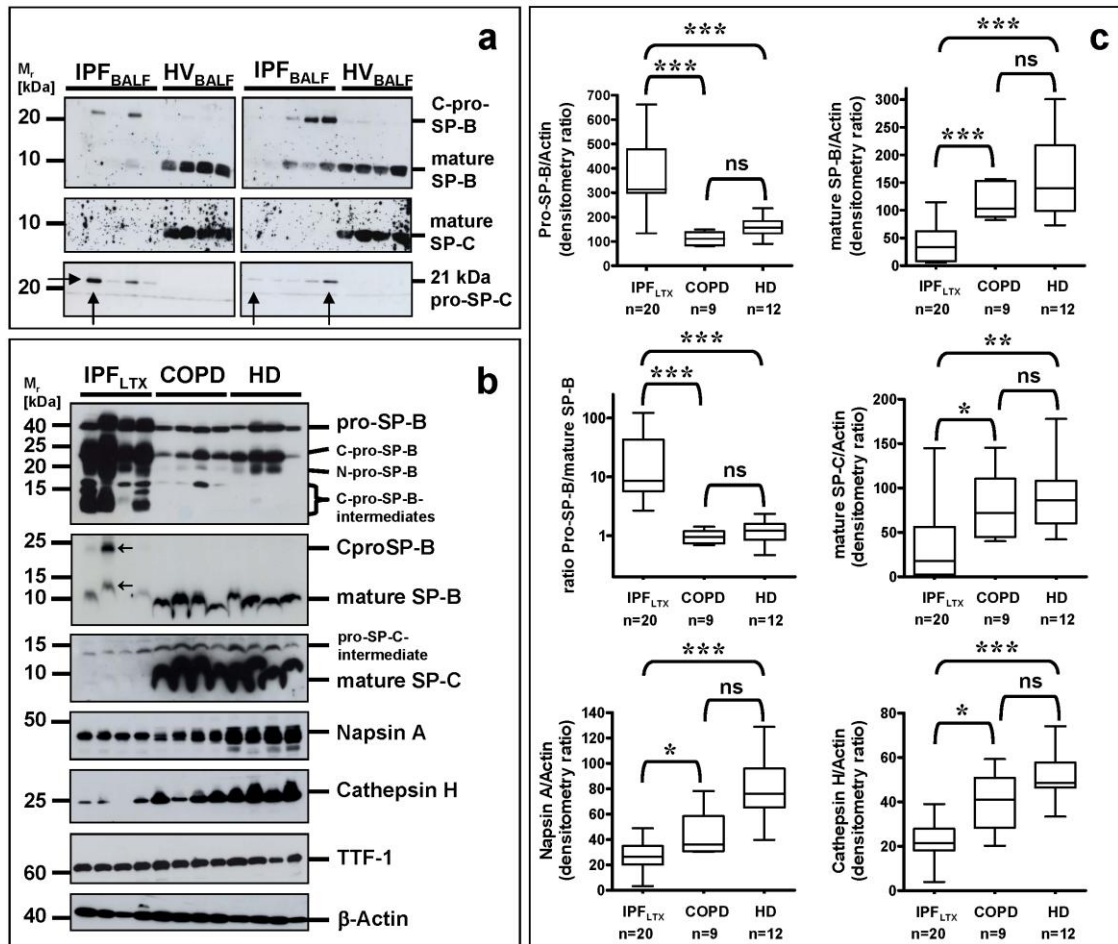


Abbildung 25: Fehlerhafte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) [Korfei et al., unveröffentlicht]

(a) Western Blot der BAL von Patienten mit IPF (IPF_{BALF}, n=10) und gesunden Freiwilligen (HV_{BALF}, n=8), inkubiert mit Antikörpern gegen matures SP-B und SP-C sowie pro-SP-C. Jeder Western Blot wurde auf einem anderen Gel durchgeführt, auf dem die gleichen Proben in der gleichen Reihenfolge aufgetragen wurden. Repräsentative (b) und quantitative (c) Western Blot-Analyse von peripherem Lungengewebe von Patienten mit IPF (IPF_{LTX}, n=20) und COPD (n=9) sowie von Spenderlungen (HD, n=8). Inkubiert wurde mit Antikörpern gegen pro-SP-B, mature SP-B und SP-C, Napsin A, Kathepsin H, TTF-1 und β-actin. Die Daten in (c) sind als densitometrisches Verhältnis des jeweiligen Proteins im Verhältnis zu β-actin dargestellt und als Box-Whisker-Plot abgebildet (Box-Begrenzung durch das obere und untere Quartil, horizontale Linie als Darstellung des Medians, die oberen und unteren senkrechten Linien bilden die Extremwerte ab). Für die Berechnung des pro-SP-B/SP-B Verhältnisses wurde die optische Dichte aller pro-SP-B-Formen addiert.

Wie bereits gezeigt, konnten sowohl in der BAL von IPF-Patienten als auch im Lungenhomogenat explantierter erkrankter Lungen reduzierte Spiegel der maturen hydrophoben Surfactantproteine nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten sich unkomplett prozessierte Proteinvorstufen. Die an der Prozessierung beteiligten Proteasen Napsin A und Kathepsin H lagen im Lungenhomogenat deutlich reduziert vor. Diese Veränderungen sind im Vergleich mit COPD-Patienten wie auch mit Gesunden stets statistisch signifikant.

Densitometrische Auswertung

Zur Auswertung der Ergebnisse aus der Western Blot-Analyse wurden die entwickelten Filme zunächst mit Hilfe des Computer-gestützten „AlphaEase[®]FC Imaging System (San Leandro, CA)“ eingescannt. Dann erfolgte die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten mit der Computer-Software dieses Imaging-Systems. Anschließend wurden die erhaltenen Intensitäts-Werte in das Verhältnis zu den Bandenintensitäten der Ladekontrolle (β -Aktin) gesetzt (Normierung).

8.2 Abkürzungsverzeichnis

ABCA	<i>ATP (Adenosintriphosphat) binding cassette Subtyp A</i>
AECII	Alveoläre Epithelzelle Typ II
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAL/BALF	Bronchoalveoläre Lavage/flüssigkeit
Ca	Calcium
CCT α	<i>CTP (Cytidintriphosphat) phosphocholine cytidylyltransferase α</i>
cDNA	komplementäre/ <i>complementary</i> DNA
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancing-binding protein α</i>
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung/ <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure/ <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPLD	Diffus parenchymatöse Lungenerkrankung/ <i>Diffuse Parenchymal Lung Disease</i>
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
EAA	Exogen Allergische Alveolitis
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FAT/CD 36	fatty acid translocase/ <i>Cluster of differentiation 36</i>
FS	freiwilliger Spender
Gly	Glycin

HR-CT	hochauflösende/ <i>High Resolution</i> Computertomographie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IIP	Idiopathische interstitielle Pneumonie
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung/ <i>Interstitial Lung Disease</i>
IPF	Idiopathische Pulmonale Fibrose
kb	1000 Basenpaare
kDa	kilo Dalton
Leu	Leucin
LTX	Lungentransplantat
Lys	Lysin
Met	Methionin
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
mg	Milligramm (10 ⁻³ g)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NAC	N-Acetylcystein
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)
NSIP	nicht-spezifische interstitielle Pneumonie
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Phosphatidylglycerol
PGE	Prostaglandin E
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure/ <i>ribonucleic acid</i>

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Ser	Serin
SREBP-1C	<i>sterol regulatory element binding protein-1C</i>
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TTF	<i>Thyroid transcription factor</i>
UIP	<i>usual interstitial pneumonia</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VATS	Video-assistierte Thorakoskopie
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Zusammensetzung des pulmonalen Surfactants	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Anordnung mehrerer SP-A-Untereinheiten zu einem Hexamer [modifiziert nach Spissinger et al., 1991]	4
Abbildung 3: Struktur von SP-B [Johansson et al., 1994]	5
Abbildung 4: Spaltstellen der bei der Prozessierung des Surfactantprotein B beteiligten Enzyme Napsin A, Pepsinogen C und Kathepsin H [modifiziert nach Ueno et al., 2004]	7
Abbildung 5: Prozessierungsschritte von pro-SP-B zum maturen SP-B, welches als Dimer sezerniert wird [modifiziert nach Brasch et al., 2002]	8
Abbildung 6: Prozessierungsschritte von pro-SP-C zum maturen Protein [Brasch et al., 2002]	9
Abbildung 7: Alveole mit schematischer Darstellung des Surfactant-Stoffwechsels [modifiziert nach Hawgood, Clements, 1990]	12
Abbildung 8: Interaktion der hydrophoben Surfactantproteine B und C mit den Phospholipiden [Possmayer et al., 2001]	13
Abbildung 9: Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine Idiopathische interstitielle Pneumonie [Günther et al., 2003, modifiziert nach Raghu et al., 2011]	18
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Lungenaufbereitung	33
Abbildung 11: Charakteristische Chromatogramme von Lungenphospholipiden von Patienten mit IPF und Donoren	52
Abbildung 12: Proteingehalt der maturen Formen von SP-B und SP-C in der BAL von Patienten mit sporadischer IPF (IPF _{BALF}) im Vergleich zu Spenderlavagen (FS _{BALF})	54
Abbildung 13: Proteingehalt von Proformen der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C sowie von maturem SP-B in der BAL von Patienten mit sporadischer IPF (IPF _{BALF}) im Vergleich zu Spenderlavagen (FS _{BALF})	55
Abbildung 14: Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF	57
Abbildung 15: Untersuchungen zur Dimerisierung des hydrophoben Surfactantproteins SP-B in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF und Spenderlungen	58
Abbildung 16: Genexpression von SP-A, SP-B, SP-C und SP-D, Napsin A und Kathepsin H, ABCA3 (Marker für Typ-II-Zellen), Na ⁺ , K ⁺ -ATPase (Marker für Typ-I- und Typ-II-Zellen), Clara-Zell-Protein CC10 (Marker für Clara-Zellen) und β -Aktin in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=10) im Vergleich zu gesunden Spendern (n=6)	60
Abbildung 17: Reduzierte Napsin A-Aktivität in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=9) im Vergleich zu Patienten mit COPD (n=9) und gesunden Spenderlungen (Donor, n=12)	61

Abbildung 18: Prozessierungsstörungen der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in Patienten mit sporadischer IPF zum Zeitpunkt der Diagnose (IPF _{VATS} ; <i>early-stage</i> IPF)	62
Abbildung 19: Gestörte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C in beiden IIP-Entitäten IPF und fibrosierender NSIP, nicht aber in COPD- und Spenderlungen	64
Abbildung 20: Analyse der Proteinspiegel des hydrophilen Surfactantproteins A in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF im Vergleich zu gesunden Spenderlungen. (A) Western Blot-Analyse von BAL, (B) Western Blot-Analyse von Lungengewebe	65
Abbildung 21: Signifikant reduzierte Konzentration an Gesamt-Phospholipiden in Lungen von Patienten mit sporadischer IPF (n=14) und fibrosierender NSIP (n=7) im Vergleich zu COPD-Patienten (n=7) und gesunden Spendern (n=8)	66
Abbildung 22: Konzentration der Surfactantphospholipide Phosphatidylcholin (PC) [A] und Phosphatidylglycerol (PG) [B] in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=14) und NSIP (n=7) im Vergleich zu COPD-Patienten (n=7) und gesunden Spendern (n=8)	67
Abbildung 23: Genexpression von FAT/CD36, CCT α und β -Aktin als Ladungskontrolle in Lungengewebe von Patienten mit sporadischer IPF (n=10) im Vergleich zu gesunden Spendern (n=6)	68
Abbildung 24: Übersicht über die Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C bei Patienten mit sporadischer IPF und fibrosierender NSIP im Vergleich zu Spenderlungen [Günther, A]	71
Abbildung 25: Fehlerhafte Prozessierung der hydrophoben Surfactantproteine bei der Idiopathischen Pulmonalen Fibrose (IPF) [Korfei et al., unveröffentlicht]	98

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demografische und klinische Daten der Patientenkollektive (Lungengewebe/UGMLC-Biobank)	34
Tabelle 2: Demografische und klinische Daten der Patientenkollektive (BALF/UGMLC-Bio- bank)	35
Tabelle 3: Pepettierschema des Sammel- und Trenngels für die SDS-Pages	43
Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels bei der SDS-Page	44

Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, **Koch M**, Lang G, Fink L, Bohle RM, Seeger W, Weaver TE, Guenther A. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2008; 178(8):838-46

Erklärung

Ich erkläre:

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Meinem Betreuer und Doktorvater Professor Dr. med. Andreas Günther gilt mein ganz besonderer Dank. Seine wissenschaftliche Kompetenz und Leidenschaft für das Thema sowie seine Zugänglichkeit waren mir eine große Stütze und Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit.

Professor Dr. med. Werner Seeger danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und für das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. rer. nat. Martina Korfei. Durch ihre kompetente Unterstützung bei der Einarbeitung in das Thema und in die experimentelle Analytik wurden diese Ergebnisse überhaupt erst ermöglicht. Während des Verfassens meiner Arbeit stand sie mir mit unerschöpflicher Hilfe zur Seite.

Weiter danken möchte ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Surfactant-Labors, die mir durch ihre freundliche und hilfsbereite Art mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich denke sehr gerne an die gemeinsame Zeit im Labor zurück!

Zuletzt möchte ich meinen größten Dank aussprechen: meinen Eltern. Auf ihre liebevolle Unterstützung kann ich immer vertrauen. Ohne euch wäre all das kaum möglich gewesen!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



Cover photo: © Alexandr Mitiuc - Fotolia.com